

**AUSWIRKUNGEN DER
TIEFGEFRIERKONSERVIERUNG AUF DIE
AKROSIN- UND GOT-AKTIVITÄT SOWIE
DIE AKROSOMENMORPHOLOGIE
VON EBERSPERMIEN**

Axel Klenner

1975

Das Institut für Geschichte der Naturwissenschaften
an der Universität zu Köln
hat das Manuskript erworben und es ist nun
im Besitz des Instituts.

Verfasser: Verfasser: Dr. A. Schmidt

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Andrologie und künstliche Besamung
an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. W. Leidl

AUSWIRKUNGEN DER TIEFGEFRIERKONSERVIERUNG
AUF DIE AKROSIN- UND GOT-AKTIVITÄT
SOWIE DIE AKROSOMENMORPHOLOGIE
VON EBERSPERMIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Axel Klenner
aus Lublin

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. H. Kräußlich

Tag der Promotion: 18. Juli 1975



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	4
2. LITERATUR	6
2.1. Tiefgefrierung von Ebersperma	6
2.1.1. Glyzerin als Gefrier- schutzmittel	6
2.1.2. Ersatz von Glyzerin	9
2.1.3. Gefriertechniken	10
2.1.4. Auftautechniken	16
2.2. Bestimmung des extrazellulären GOT-Gehaltes	18
2.3. Das Akrosom und akrosomale Enzyme	22
2.3.1. Ultrastruktur des Eberakrosoms	22
2.3.2. Strukturveränderungen des Akrosoms	23
2.3.3. Untersuchung der morphologischen Beschaffenheit des Akrosoms	25
2.3.4. Enzymausstattung des Akrosoms	28
2.3.5. Akrosin	29
2.3.5.1. Charakterisierung von Akrosin	30
2.3.5.2. Biologische Funktion des Akrosins	32
2.3.5.3. Akrosinaktivitätsbestimmung im klinisch-diagnostischen Bereich	34

	Seite
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	37
3.1. Versuchstiere und Versuchsanordnung	37
3.1.1. Versuchsaufbau	37
3.1.2. Gewinnung und Untersuchung der Ejakulate	41
3.1.3. Verdünnungs- und Auftaumedien	42
3.1.3.1. Zusammensetzung und Herstel- lung des Tiefgefrierverdün- ners	42
3.1.3.2. Auftaulösung	44
3.2. Methoden	45
3.2.1. Tiefgefrierkonservierung	45
3.2.2. Auftaumethoden	45
3.2.3. Photometrische Akrosinbe- stimmung	47
3.2.3.1. Gewinnung der Spermien- extrakte	47
3.2.3.2. Quantitative photometrische Bestimmung der Akrosinak- tivität	47
3.2.4. Quantitative photometrische Bestimmung der Glutamat- Oxalacetat-Transaminase (GOT)	50
3.2.4.1. GOT-Aktivität in Tiefgefrier- verdünner und Auftaulösung	51
3.2.5. Beurteilung der Akrosomenmor- phologie	52
3.3. Ergebnisse	55
3.3.1. Statistische Auswertung (Überblick)	55

3.3.2. Auswirkung der Abkühlung und Tiefgefrierung auf Eberspermien	56
3.3.2.1. GOT- und Akrosin-Aktivität sowie Akrosomenmorphologie von Nativ- bzw. mit 2 % Glyzerin vermischem Sperma	57
3.3.2.2. Einfluss des Tiefgefrierverdünners (2 % Glyzerinendkonzentration) auf die Eberspermien während Abkühlung und Tiefgefrierung	61
3.3.2.3. Auswirkungen steigender Glyzerinkonzentration in Tiefgefrierverdünnern auf Eberspermien	64
3.3.2.4. Einfluss verschiedener Auftaumethoden auf die GOT- und Akrosinaktivität sowie die Akrosomenmorphologie tiefgefrierkonservierter Eberspermien	69
3.3.2.5. Korrelationen zwischen der Akrosin- und GOT-Aktivität sowie der Akrosomenmorphologie von Eberspermien	75
4. DISKUSSION	78
5. ZUSAMMENFASSUNG	89
6. STATISTISCHER und TABELLARISCHER ANHANG	95
7. LITERATURVERZEICHNIS	115
Lebenslauf	147

1. EINLEITUNG

Ein praxisreifes Verfahren zur Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma, das durch reproduzierbare Befruchtungserfolge eine überregionale Verwendung in der künstlichen Besamung ermöglicht, ist trotz intensiver Bemühungen bis heute nicht gefunden worden.

Durch Variationen der Gefriertechniken anhand anderer Kriterien (Beurteilung der Kopfkappenmorphologie und Messung der GOT-Aktivität) als die für die Bewertung tiefgefrorenen Bullenspermas allgemein übliche Schätzung der Bewegungsaktivität konnte das Problem ungenügender Konzeptionsraten nicht bewältigt werden.

Wenig Beachtung fanden bisher im Rahmen solcher Untersuchungen im Akrosom der Spermien lokalisierte Enzyme, die zu einem grossen Teil an der Spermienpenetration in das Ei beteiligt sind. Eine wichtige Rolle bei der Befruchtung wird vor allem der akrosomalen Protease Akrosin zugeschrieben. Da durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bekannt ist, dass der Tiefgefrierprozess hauptsächlich das akrosomale System der Spermien schädigt, liegt es nahe, auch eine Beeinflussung der Enzyme dieses Systems zu vermuten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der

Tiefgefrierung auf die Akrosinaktivität von Eberspermien überprüft. Als weitere Parameter wurden die Bestimmung der GOT-Aktivität und der Akrosomenmorphologie hinzugezogen.

2. LITERATUR

2.1. Tiefgefrierung von Ebersperma

2.1.1. Glyzerin als Gefrierschutzmittel

Nachdem es 1949 durch Glyzerinzusatz zu Verdünnungsmedien gelungen war, Bullensamen vor den schädigenden Einflüssen der Tiefgefrierung zu schützen und bei Aufrechterhaltung der Befruchtungsfähigkeit über längere Zeit hinweg lagerfähig zu halten (POLGE et al., 1949), konnten in der Folgezeit Verfahren entwickelt werden, die eine Ausnützung der züchterischen und wirtschaftlichen Vorteile tiefgefrierkonservierten Bullenspermas in der künstlichen Besamung ermöglichten. Eine Übertragung der hier gewonnenen Erkenntnisse und Praktiken auf die Tiefgefrierung von Ebersperma gelang nicht.

Die Befruchtungskapazität von Eberspermien wurde durch Glyzerinzusätze, wie sie in der Bullenspermakonservierung gebräuchlich waren, stark herabgesetzt. Besamungsversuche von POLGE (1956) mit flüssig konserviertem Ebersperma, das 5 % Glyzerin enthielt, führten bei 58,3 % der Tiere zu Trächtigkeit, mit 7,5 % Glyzerinzusatz wurden nur 20 % tragend. Mit anderen Verdünnungsmedien untersuchten KING und MacPHERSON (1966) den Einfluss von 2,5 % bzw. 7,5 % Glyzerinzusatz auf die Fertilität ungefrorenen Eberspermas und beobachteten wie POLGE (1956) und LEIDL (1968) mit steigendem Glyzerinzusatz eine Fertilitätssenkung. Ein vergleichbares Ergebnis er-

hielten GRAHAM et al. (1971a) mit Befruchtungsraten von 8 %, 48 % und 82 % bei Glycerinzusatz von 7 %, 5 % und 2 %.

Ein positiver Effekt durch hohe Glycerinkonzentrationen (7 - 10 %) zeigte sich lediglich in Bezug auf die Motilität der Spermien nach dem Auftauen. Besamungen mit diesem Sperma führten jedoch zu keiner Trächtigkeit (SETTERGREN, 1958; POLGE, 1959; LEIDL, 1968). Diese Ergebnisse wurden von GRAHAM et al. (1971b) bestätigt, die nach Insemination von tiefgefrorenem Sperma ohne Glycerinzusatz eine Befruchtungsrate von 46 %, mit 1 und 7 % Glycerinzusatz dagegen 15,4% bzw. keine Trächtigkeit erzielten.

Den Einfluss hoher Glycerinkonzentrationen in Eberspermaverdünnungen auf die Entwicklung befruchteter Eizellen untersuchten NEVILLE et al. (1970). Nach Zusatz von 20 % Glycerin betrug der Anteil der normal entwickelten Eizellen 32,2 % gegenüber dem des Kontrollwertes mit 57,1 %.

Durch Insemination tiefgefrorenen Spermas nach Laparatomie direkt in die Uterushornspitzen (chirurgische Besamung) konnten WILMUT und POLGE (1971) nachweisen, dass Glycerinzusätze über 2 % den Prozentsatz befruchteter Eier signifikant senken und dass die Schätzung der Bewegungsaktivität gefrierkonservierter Spermien nach dem Auftauen keine ausreichende Aussagekraft über eine zu erwartende Befruchtungsfähigkeit besitzt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass einerseits ein hoher Glycerinanteil zur Erzielung maximaler Auftauraten günstig ist, andererseits aber in diesen Mengen

das Konzeptionsvermögen beeinträchtigt.

Nach WILMUT und POLGE (1974) ist das Ausmass der durch Glyzerin verursachten Fertilitätsminderung temperatur- und zeitabhängig. In ihren Versuchen besaßen flüssig konservierte Eberspermien nach sechsständiger Inkubationszeit bei $+20^{\circ}\text{C}$ und 5 - 10 %-igem Glyzerinzusatz ein stark vermindertes Befruchtungsvermögen. Im Gegensatz dazu hatte eine sechsständige Lagerung bei $+5^{\circ}\text{C}$ bzw. eine dreissigminütige Lagerung bei $+20^{\circ}\text{C}$ mit gleicher Glyzerinkonzentration keine negative Auswirkung auf die Befruchtungsfähigkeit.

Als mögliche Ursache der schlechten Befruchtungsergebnisse wird der stark verminderte Sauerstoffverbrauch von verdünntem und tiefgefrorenem Ebersperma (TG-Sperma) angesehen (SANFORD et al., 1972). Durch 7,5 bzw. 15 % Glyzerinanteil in einem Magermilch-Glukose-Verdüner wird der Sauerstoffverbrauch ungefrorener Spermien gegenüber der Kontrolle um 43 % bzw. 60 % gesenkt. Vergleichende Messungen mit tiefgefrorenen Proben gleicher Glyzerinkonzentration zeigten dagegen nach dem Auftauen einen um 88 % reduzierten Sauerstoffverbrauch.

Eine weitere Erklärung für die schädliche Wirkung des Glyzerins können ferner die Beobachtungen von HOOD et al. (1970) sowie PURSEL et al. (1969a) geben, die nach Kälteschock bzw. Tiefgefrierung bei Eberspermien Störungen innerhalb des intrazellulären Elektrolythaushaltes feststellten, welche durch glyzerinhaltige Verdünnungsmedien nicht verhindert, sondern verstärkt wurden.

Konzeptionen nach Insemination von TG-Sperma, das 6 % Glyzerin (HESS et al., 1957) bzw. 9 % Glyzerin (HOFFMANN, 1959; BAIER, 1962) als Gefrierschutzsubstanz enthielt, blieben Einzelerfolge, die nicht reproduziert werden konnten.

2.1.2. Ersatz von Glyzerin

Wegen der toxischen Wirkung auf die Spermien war es naheliegend, das Glyzerin ganz oder teilweise durch andere Substanzen mit kälteschützenden Eigenschaften zu ersetzen. Allerdings ist es bis heute noch nicht gelungen, ein dem Glyzerin ebenbürtiges Kryoprotektivum zu finden.

Durch Verwendung eines Honig-Eidotter-Gemisches als Verdünnungsmedium wurden durch niedrig bemessene Glyzerinzusätze von 1,5 und 3 % einerseits gute Auftauergebnisse erzielt, andererseits eine negative Beeinflussung der Befruchtungskapazität von TG-Sperma weitgehend ausgeschaltet (BAMBA et al., 1968b). Für die kryoprotektiven Eigenschaften des Honigs waren nach Ansicht der Autoren neben Aminosäuren und Vitaminen vor allem die in hohen Konzentrationen vorhandenen Zucker wie Glukose und Fruktose verantwortlich.

Weder hoch- noch niedermolekulare Zucker wie Inositol, Dulcitol bzw. Adonitol und Xylitol erbrachten eine dem Glyzerin überlegenen Gefrierschutzwirkung (SALAMON et al., 1973). Ein Glyzerinersatz durch

nicht permeable Stoffe wie Dextrin, Pepton, Methylzellulose, Äthylentetraessigsäure (SALAMON et al., 1973) und Polyvinylpyrrolidon (SALAMON et al., 1973; GRAHAM und CRABO, 1972; SCHÖRNER, 1974) als auch durch permeable Gefrierschutzmittel wie Dimethylsulfoxid (GRAHAM und CRABO, 1972; HOOD et al., 1970; KOJIMA et al., 1967; ROHLOFF, 1967a; WILMUT und POLGE, 1972; SCHÖRNER, 1974) erwies sich als unzureichend. Andere permeable Kryoprotektiva wie Acetonamid und Erythrit erbrachten nach Beurteilung der Bewegungsaktivität tiefgefrorener Eberspermien eine dem Glyzerin vergleichbare Schutzwirkung. Wurde jedoch der mit aufgetautem Sperma erzielte Prozentsatz befruchteter Eizellen als Bewertungsmaßstab herangezogen, waren die Befruchtungsraten im Vergleich zu Proben mit Glyzerin signifikant geringer (WILMUT und POLGE, 1972).

DALRYMPLE und MacPHERSON (1969) konnten zwar durch Verwendung von NN-Dimethylacetamid bei gleichbleibender Auftaurate den Glyzeringehalt in Eberspermaverdünnungen auf 3,8 % senken, Besamungen blieben jedoch erfolglos.

2.1.3. Gefriertechniken

Die von NAGASE und NIWA (1964) entwickelte Gefriermethode, bei der verdünntes, auf +5°C abgekühltes Bullensperma in Tropfenform (Pellets) auf Kohlendioxydeisscheiben "sturzgefroren" (Pelletiert) wird, ergab im Vergleich zum konventionellen Zweistufen-

verfahren des Tiefgefrierens in Ampullen bessere Überlebensraten.

Die Möglichkeit, mittels dieses Verfahrens die Glyzerinkonzentrationen in Tiefgefrierverdünnern zu senken sowie die Tatsache, dass Bullenspermien mit Erfolg auch ohne Glyzerinzusatz eingefroren werden konnten (NAGASE et al., 1964a), liess die "Pelletmethode" auch für die Gefrierkonservierung von Eberspermien interessant erscheinen. So wurden mit pelletiertem und in flüssigem Stickstoff gelagertem Ebersamen (TGN_2 -Sperma) bis zu 45 % (ROHLOFF, 1967b), später mit Sperma verdünnungen, die lediglich 2 - 4 % Glyzerin enthielten, 50 - 60 % bzw. 65 % motile Samenzellen nach dem Auftauen beobachtet (ROHLOFF und ALLMELING, 1970; GROVE et al., 1968).

Durch vergleichende Untersuchungen über die Auswirkungen der Kühlgeschwindigkeiten verschiedener Gefriertechniken auf die Auftauraten von Ebersamen stellte sich heraus, dass die wesentlich geringeren Kühlgeschwindigkeiten herkömmlicher Einfriertechniken - im Gegensatz zu Abkühlraten von 60 - 70°C/Min., wie sie bei der Pelletmethode verwendet werden - eine schonendere Tiefgefrierung ermöglichen (DALRYMPLE und MacPHERSON, 1969). Die Autoren vertraten ebenso wie HOFFMANN (1959), HESS et al. (1960), DUKELOW und GRAHAM (1962), BADER (1964) und BAMBA et al. (1968a) die Ansicht, dass ein langsames Einfrieren mit Kühlraten von 1 - 2°C/Min. einer Sturzgefrierung überlegen ist.

Die, wenn auch sehr niedrigen - Konzeptionsraten, die PURSEL et al. (1969b) nach Inseminationen mit

TGN₂-Sperma erzielen, zeigen, dass mit dem nach der Pelletmethode eingefrorenen Sperma Befruchtungen möglich sind. Dies bestätigten POLGE et al. (1970) sowie SALAMON und VISSER (1974) in ihren Inseminationsuntersuchungen an zyklussynchronisierten Sauen. Nach intracervical durchgeführten Besamungen mit pelletiertem Sperma vier Stunden vor bzw. eine Stunde nach dem Beginn des Östrus war keine der 236 durch Spülung gewonnenen Eizellen befruchtet. Nach Applikation des konservierten Spermas (chirurgische Besamung) direkt in den Eileiter und die Uterushornspitzen, sechs und 20 Stunden vor bzw. 4 Stunden nach der Brunst zyklussynchronisierter Sauen betrug der Prozentsatz befruchteter Eizellen 91 und 38 % bzw. 76 %. Die durch diese Inseminationstechnik mit TGN₂-Sperma und vergleichend mit Nativsperma erzielten Konzeptionsraten unterschieden sich nicht (POLGE et al., 1970).

SALAMON und VISSER (1974), die 10 bis 30 Stunden nach Auftreten der natürlichen Brunst chirurgisch TGN₂-Sperma über die utero-tubale Verbindung in die Eileiter einbrachten, erreichten ein Konzeptionsergebnis von durchschnittlich 50 %. Die Differenz zwischen diesen und den von POLGE et al. (1970) erzielten Befruchtungsraten führten die Autoren auf genetische Unterschiede zwischen den Versuchstieren sowie die schwierige Abstimmung des Inseminations- und Ovulationszeitpunktes im Verlauf einer natürlichen Brunst zurück.

Die zur Erzielung guter Befruchtungsergebnisse benötigte erheblich grössere Anzahl tiefgefrierkonservierter Spermien zeigte, dass ein grosser Teil der

aufgetauten und motilen Spermien eine im Vergleich zu frischen Spermien verminderte Befruchtungskapazität besass (WILMUT und POLGE, 1971).

Aufbauend auf diese Ergebnisse suchten einige Arbeitsgruppen durch Verbesserungen der Verdünnungsmedien und -techniken ähnlich gute Befruchtungsergebnisse auch durch Besamungen über die Zervix zu erhalten.

Die Verwendung von TES (Tris(Hydroxy-methyl)methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure), einem zwitterionischen Puffer, in Verbindung mit dem auch bisher als Verdünnergrundlage verwendeten Tris (Hydroxy-methylaminomethan) erbrachte überraschend gute Auftauergebnisse (CRABO et al., 1972a). Mit einer Verdünnung auf der Basis dieses Puffersystems, dem das oberflächenaktive Natriumlaurylsulfat (Orvus Es Paste, PROCTER & GAMBLE) beigelegt wurde, gelang erstmals eine erfolgreiche Besamung mit tiefgefrorenem Ebersperma ohne Glyzerinzusatz (GRAHAM et al., 1971a,b). Neben der Zusammensetzung des Verdünners war vor allem das Vorschalten einer zwei- bis dreistündigen "Wartezeit", in der die spermienreiche Fraktion vor Zugabe des Tiefgefrierverdünners bei Zimmertemperatur gelagert wurde, für den Erfolg ausschlaggebend. Während dieser Zeit sollen Seminalplasmaproteine einen schützenden Wall um die Spermien bilden (Coating-Effekt), ein Vorgang, der durch sofortige Zugabe eidotterhaltiger Verdünner nach der Spermagewinnung verhindert wird. GRAHAM et al. (1971a) vermuten, dass die Eidotterproteine bei Zugabe ohne Vorschaltung der Wartezeit mit den Seminalplasmaproteinen interferieren.

Im Gegensatz zu SALAMON (1973), der eine Verminderung der Gefriertauglichkeit nach Entfernung des Seminalplasmas durch Zentrifugieren feststellte, befürworteten ROY (1955), HOFFMANN (1959) sowie einige japanische Arbeitsgruppen (IIDA und IKEDA, 1966; IIDA und ADACHI, 1966; KOJIMA et al., 1967; BAMBA et al., 1968a) seine Entfernung und Resuspendierung des Spermas in entsprechenden Tiefgefrierverdünnern.

Die geringere Befruchtungskapazität von Sperma-Seminalplasma-Verdünnungen gegenüber seminalplasmafreien Spermakonservierungen führten PURSEL und JOHNSON (1971a) auf fertilitätsdepressiv wirkende Faktoren im Samenplasma zurück. Sie entwickelten eine Verdünnungstechnik, in der sie durch zweimaliges Zentrifugieren das Seminalplasma entfernten und kurz vor der Pelletierung den glyzerinhaltigen durch einen glyzerinfreien Verdünner ersetzten und somit Schädigungen durch Seminalplasma und Glyzerin auszuschalten suchten. Besamungen mit derartig vorbehandeltem, tiefgefrorenem Sperma erbrachten eine Befruchtungsrate von 74 % mit durchschnittlich 11,7 Foeten, ein Ergebnis, das bisher nur nach Besamungen mit Nativsperma erreicht wurde. HILLMANN (1972) gelang die Wiederholung dieser Resultate nicht. Auch mit einer modifizierten Methode, in der unter anderem kein Austausch des nur noch 2 % Glyzerin enthaltenden Verdünners durch glyzerinfreie Medien erfolgte, konnten nur nach sog. Doppelbesamungen, d.h. zwei Inseminationen in einem Östrus, Trächtigkeiten erzielt werden.

Ebenso wie HILLMANN (1972) stellten auch andere Autoren heraus, dass zufriedenstellende Konzeptionsraten

erst nach zwei- bis dreimaliger Insemination während einer Brunst erreicht werden (SALAMON und VISSER, 1972, 1973; ROMENY et al., 1974a, 1974b; BOEHNKE et al., 1974).

Entgegen den bisher besprochenen Verfahren, bei denen die spermienreiche Fraktion eines Ejakulates oder das durch Entfernung des Seminalplasma verdichtete Sperma zur Tiefgefrierkonservierung benutzt wurde, verdünnten RICHTER und LIEDICKE (1972) das Gesamt-ejakulat mit einem glyzerinfreien Vorverdünner (HÜLSENBERG-Verdünner), der 1 Stunde vor der Tiefgefrierung durch einen Glycerin, Eidotter und Magermilch enthaltenden Nachverdünner ersetzt wurde. Da eine non-return-Rate von 80 % bei einem durchschnittlichen Wurfergebnis von 7,4 Ferkeln später nicht reproduziert werden konnte, führten ROMENY et al. (1974a, b,c) Labor- und Besamungsversuche durch, die das Originalverfahren verbesserten und Fehlerquellen als Ursache der mangelhaften Reproduzierbarkeit ausschalten sollten. Aufgrund eines deutlichen Absinkens der Ausgangsmotilität der Samenzellen während des Konservierungs- und Auftauprozesses sowie der zu geringen Lebensdauern aufgetauter Spermien in Wärmeresistenztesten und der nicht befriedigenden Konzeptionsraten vermuteten die Autoren, dass TGN₂-Spermien nicht ausreichend lang im weiblichen Genitaltrakt überleben, um bei nicht zeitgerechtem Zusammentreffen von Inseminations- und Ovulationszeitpunkt zur Befruchtung zu gelangen. Gute, mit modifizierten "HÜLSENBERG-Verdünnern" erzielte Befruchtungsergebnisse führten ROMENY et al. (1974 b,c) auf Reduzierung des Glycerinanteils, das Vorschalten einer zweistündigen Wartezeit sowie auf das Heraufsetzen der

Gefrier Ausgangstemperatur von $+5^{\circ}$ auf $+8^{\circ}\text{C}$ zurück.

2.1.4. Auftautechniken

Mit Einführung der von NAGASE und NIWA (1964) entwickelten Pelletmethode in die Konservierungstechniken von Ebersperma begann verstärkt die Entwicklung von Auftautechniken, die eine Potenzierung der Gefrierschäden durch den Auftauprozess verhindern sollten.

SALAMON (1973) befürwortete das "trockene" Auftauen, bei dem die Pellets ohne Flüssigkeitszusatz in Gefäße verbracht und in einem Wasserbad von $+37^{\circ}\text{C}$ verflüssigt werden. Eine stärkere Erwärmung des Wasserbades auf $+50^{\circ}\text{C}$ oder $+60^{\circ}\text{C}$ bewirkte über erhöhte Auftaugeschwindigkeiten sowohl eine Verbesserung der Bewegungsaktivität (SALAMON et al., 1973) als auch der Befruchtungskapazität des TGN_2 -Spermas (PURSEL und JOHNSON, 1972; GRAHAM et al., 1971a,b).

Nach Verwendung eines glyzerinfreien Tris-Verdünners als Auftaulösung wurden durchschnittliche Auftauraten von 60 - 70 % erreicht, die über 24 Stunden hinweg anhielten (ROHLOFF, 1967a; ROHLOFF und ALLMELING, 1970).

Reines Seminalplasma bzw. Mischungen eines Tris-Verdünners mit Seminalplasma waren als Auftaumedien nicht geeignet, da sie, wie ROHLOFF und ALLMELING (1971) beobachteten, eine sofortige Agglutination der Spermien auslösten. Andere Autoren dagegen, erzielten mit TGN_2 -Sperma, das in frischem Seminalplas-

ma (CRABO und EINARSSON, 1971; CRABO et al., 1972b) oder Magermilch-Seminalplasma-Mischungen (EINARSSON et al., 1974) aufgetaut wurde, relativ hohe Konzeptionsraten von 77, 57 und 70 % mit durchschnittlich 9,8, 5,8 und 10,3 Foeten. Sie schrieben dies dem Seminalplasma, das über eine Stimulierung der Uterusmotorik den Spermientransport unterstützt, zu.

Der Tiefgefrierprozess selber beeinflusst den Spermientransport nicht (EINARSSON und VIERING, 1973; BAKER und DEGEN, 1972; SCHEFELS et al., 1971). Das Seminalplasma soll durch Eiweissverbindungen tiefgefroren gewesene Spermien vor einer frühzeitigen Eliminierung (Phagozytose) aus Uterus und Eileiter schützen (EINARSSON und VIERING, 1973), ein Effekt, der auch magermilchhaltigen Auftaulösungen zukommen soll (EINARSSON et al., 1972, 1974).

Obwohl sich Mischungen aus Magermilch und Seminalplasma sowie reines Seminalplasma auch bei weiteren Untersuchungen als geeignete Auftaumedien erwiesen, wurde eine Verminderung bzw. ein vollständiger Ersatz der Seminalplasmaanteile in Auftaulösungen wegen der Kosten und aus hygienischen Gründen für notwendig erachtet (HAHN et al., 1974; ROMENY et al., 1974b,c; BOEHNKE et al., 1974).

Gute Befruchtungsergebnisse erzielten PURSEL und JOHNSON (1974a,b) mit TGN₂-Sperma, das sie in Seminalplasma- und Magermilchmedien, welche sich aus Dextrose, Natriumzitrat und -karbonat, Kaliumchlorid und Äthylentetraessigsäure zusammensetzten, auf-tauten.

2.2. Bestimmung des extrazellulären GOT-Gehaltes

Die Beurteilung der Bewegungsaktivität als Bewertungsgrundlage für die Fertilitätskapazität tiefgefrorener und aufgetauter Eberspermien erwies sich, wie bereits erwähnt, als unzureichend (WILMUT und POLGE, 1971 und 1972), da trotz guter Motilität keine oder nur vereinzelte Befruchtungen mit gefrierkonserviertem Ebersperma erzielt wurden.

Die Tatsache, dass ein durch Zelläsionen verursachter erhöhter Blutspiegel bei Myokardinfarkten (LADUE et al., 1954; KATTUS, 1956) oder Muskeldystrophien (WHITE und HESS, 1958) diagnostisch genutzt wurde, legte es nahe, Bestimmungen des aus den Samenzellen austretenden Enzymanteiles als Parameter einer Schädigung neben den Motilitätsschätzungen zur Beurteilung TGN₂-Samens heranzuziehen.

Hierzu bietet sich die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), die sowohl intra- als auch extramitochondrial in den Zellen aller bisher untersuchten tierischen und menschlichen Gewebe gefunden wurde (BERGMEYER, 1970), an.

Eine beweiskräftige Aussage über Spermienschädigungen kann durch Enzymmessungen nur dann erhalten werden, wenn sichergestellt ist, dass eine im Seminalplasma gemessene GOT-Aktivität durch Enzymverluste der Samenzelle, nicht aber aus seminalplasmazeigenen Enzymaktivitäten resultiert. Statistisch gesicherte

Beziehungen zwischen der Spermiendichte von Bullen-ejakulaten und der im Seminalplasma gemessenen Enzymaktivität (FLIPSE, 1960; ROUSSEL und STALLCUP, 1965; PACE und GRAHAM, 1970; GRAHAM et al., 1970; BROWN et al., 1971) sowie ein gegenüber Normalwerten deutlich erhöhter Enzymspiegel des Samenplasmas nach stärkster Schädigung der Spermien durch Sturzgefrieren in flüssigem Stickstoff (GRAHAM und PACE, 1967; GRAHAM et al., 1970) weisen auf eine überwiegend intrazelluläre Lokalisation der GOT hin. Dass dieses Enzym aus den Samenzellen stammt, wurde von PACE und GRAHAM (1970) bewiesen, die in vergleichenden GOT-Bestimmungen im Seminalplasma eines Bullen nach Durchtrennung beider Nebenhodenkörper im spermienfreien Ejakulat nur noch minimale GOT-Aktivitäten feststellten.

Wie bei Human-, Hengst- und Bullensperma (RÄTZ und MATTHEUS, 1972; HILLMANN und TREU, 1974; BROWN et al., 1971) ist auch beim Ebersperma der GOT-Gehalt im Samenplasma von der Spermiendichte abhängig (HILLMANN, 1972; HILLMANN und TREU, 1973; BOWER et al., 1973).

PURSEL et al. (1969c) trennten durch Zentrifugieren Samenzellen und Samenplasma und froren beide Anteile getrennt ein. Nach dem Auftauen erhielten sie aus den Spermien vielfach höhere Enzymaktivitäten als aus den Seminalplasmaproben. Diese Beobachtung sowie eine vermehrte Enzymaktivität im Samenplasma als Folge einer maximalen Spermienschädigung (GRAHAM und PACE, 1967) und die Feststellung, dass ein Verlust der GOT-Aktivität der Spermien gleichzeitig einen Anstieg der Enzymaktivität im Seminalplasma bewirkte (PURSEL et al., 1970) zeigten, dass beim Ebersperma die GOT primär aus den Spermien stammt.

Daraus ergab sich die Möglichkeit, anhand von Messungen der extrazellulären GOT-Aktivität eine Beeinflussung der Samenqualität durch unterschiedliche Faktoren zu überprüfen.

Während, gemessen an der GOT-Aktivität im Seminalplasma, erst Glyzerinzusätze zwischen 7 und 15 % tiefgefrorenes Bullensperma wirkungsvoll zu schützen vermochten (PACE und GRAHAM, 1970), bewirkten Glyzerinkonzentrationen über 2 % einen mit steigender Konzentration verstärkten Enzymaustritt aus Eberspermien (BOWER et al., 1973). Dieser war unabhängig sowohl von der Methode der Glyzerinisierung als auch der Temperatur, bei der der Glyzerinzusatz erfolgte (CRABO et al., 1970; BOWER et al., 1973).

Die Ergebnisse der bereits erwähnten Untersuchungen von CRABO et al. (1972a), GRAHAM und CRABO (1972), GRAHAM et al. (1971a,b), HILLMANN (1972), HILLMANN und TREU (1973), BOEHNKE et al. (1974) und ROMENEY et al. (1974b,c) über die Einflüsse unterschiedlicher Verdünnungsmedien und -techniken, Gefrierschutzsubstanzen sowie Gefrier- und Auftautechniken auf die Lebensfähigkeit bzw. das Befruchtungsvermögen tiefgefrorener Eberspermien, konnten mittels Bestimmung des extrazellulären GOT-Gehaltes objektiviert werden. Bei Eberspermien fand HILLMANN (1972) schlechte Auftauergebnisse (Motilität <5%) mit hohen extrazellulären GOT-Aktivitäten korreliert. BOEHNKE et al. (1974) dagegen stellten keine gesicherten Beziehungen weder zwischen der von den Spermien freigesetzten GOT-Aktivität und dem prozentualen Anteil beweglicher Spermien nach dem Auftauen noch zwischen

Befruchtungsergebnissen und Enzymverlusten fest.

Dagegen bestanden beim Bullen schon zwischen frischem, natürlich belassenem Ejakulat verschiedener Tiere individuelle Unterschiede des GOT-Vorkommens, die eine deutliche Korrelation zur Fertilität aufwiesen. Bullen mit geringerer Fruchtbarkeit (non-return-Rate $< 65\%$) wiesen einen signifikant höheren Enzymspiegel im Samenplasma auf als Bullen mit guter Fruchtbarkeit (non-return-Rate $> 65\%$; BREEUWSMA, 1972). Ebenfalls gesicherte Beziehungen zwischen der GOT-Aktivität der Spermien und der Fertilität der Bullen sowie zwischen der in den Spermien nach Routinetiefgefrierung messbaren GOT-Aktivität und dem Befruchtungsvermögen erhielten PACE und GRAHAM (1970).

2.3. Das Akrosom und akrosomale Enzyme

2.3.1. Ultrastruktur des Eberakrosoms

Ungefähr $3/4$ des Spermienkopfes werden von einer kappenähnlichen Struktur - dem Akrosom - bedeckt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint das Akrosom als eine mässig dichte, homogene Substanz, die von einer doppelschichtigen Membran (äussere und innere Akrosomenmembran) in ähnlicher Dicke wie die den gesamten Kopf bedeckende Plasmamembran umschlossen wird (NICANDER und BANE, 1962, 1966). Mit Ausnahme einer prominenten, wulstartigen Verdickung über der Kernspitze variiert die Dicke des Akrosoms zwischen 60 bis 70 nm. Im Bereich des Äquatorialgebietes besitzt der Kern durch eine Verjüngung des Akrosoms auf 30 bis 40 nm eine wesentlich geringere Auflage akrosomalen Inhalts. Der zwischen Akrosom und Kern bestehende, schmale subakrosomale Raum wird dadurch abrupt erweitert und ist mit einer opaken, elektronendichten Substanz ausgefüllt (NICANDER und BANE, 1962, 1966).

Eine mögliche Beziehung zwischen diesem subakrosomalen Raum und dem bei Nagerspermien nach Verlust des Akrosoms deutlich sichtbaren "Perforatorium" wird von einigen Autoren im Hinblick auf Befruchtungsmechanismen diskutiert (NICANDER und BANE, 1962; BANE und NICANDER, 1963; AUSTIN und BISHOP, 1958 a,b). Im Gegensatz zu BISHOP und AUSTIN (1957) und HANCOCK (1956), die das Akrosom als ein aus zwei getrennten Strukturen - dem äusseren und inneren Akrosom -

zusammengesetzt beschrieben, kann anhand der neueren Untersuchungen das Akrosom der Säugetierspermien als ein einheitliches Gebilde betrachtet werden (NICANDER und BANE, 1962, 1966).

2.3.2. Strukturveränderungen des Akrosoms

Schwere Noxen, wie Tiefgefrierung und prolongierte Lagerung der Spermien bei unphysiologischen Temperaturen wirken hauptsächlich auf den Spermienkopf und hier in erster Linie auf das Akrosom ein. Graduelle Unterschiede bestehen dabei von Spezies zu Spezies. Während Plasma- und Akrosomenmembran bei Bullenspermien relativ widerstandsfähig gegen unphysiologische Einwirkungen sind (JONES, 1972, 1973b) bzw. selbst nach Tiefgefrierung ebenso wie Hengstspermien kaum Veränderungen aufweisen (HEALEY, 1969), werden strukturelle Veränderungen der Membranen sowie des akrosomalen Inhaltes bei Schafbock- (HEALEY, 1969; JONES, 1972, 1973a,b; QUINN et al., 1969) und Humanspermien (SCHILL und WOLFF, 1974a,b; PEDERSEN und LEBECH, 1971) vor allem aber auch bei Eberspermien beobachtet (HEALEY, 1969; KUNZE et al., 1972; JONES, 1972, 1973a,b). Ausgehend von Auflösungen der Plasmamembran treten nach Noxen besonders im apikalen Teil des Akrosoms intensive Destrukturierungen auf, die als Blasenbildung und wellenartige Veränderungen der Akrosomenoberfläche und einem Zerfall der akrosomalen Feinstruktur - Verdichtungen und Aufhellungen der Substanz sowie Bildung von Vakuolen innerhalb des Akrosoms - sichtbar werden. Parallel hierzu erfolgt eine De-

formation der äusseren Akrosomenmembran, die über Invaginationen mit der inneren Membran fusioniert oder bei weiter fortgeschrittener Zerstörung vollkommen abgelöst wird, so dass der Kern lediglich von der inneren Akrosomenmembran bedeckt wird. Auffallend ist hierbei, dass im Gebiet des Äquatorialsegmentes sowohl Plasma- als auch äussere Akrosomenmembran sowie die akrosomale Feinstruktur intakt bleiben (KUNZE et al., 1972; JONES, 1972, 1973a,b).

Gleiche oder ähnliche morphologische Veränderungen werden bei Spermien, die sich unmittelbar in der Nähe des Eies befinden oder die Zona pellucida berühren, beobachtet (HADEK, 1963; BARROS et al., 1967; AUSTIN und BISHOP, 1958a; FRANKLIN et al., 1968, 1970; BEDFORD, 1969, 1970). Da diese Veränderungen sehr den eben skizzierten Strukturschäden gleichen, wurde der sogenannten "Akrosomenreaktion" (FRANKLIN et al., 1968, 1970; AUSTIN und BISHOP, 1958b) eine Spezifität abgesprochen. BEDFORD (1969, 1970) dagegen bezeichnete die in der Nähe des Eies stattfindenden Veränderungen als "echte Akrosomenreaktion", bei der aus den durch Verschmelzung der Plasma- mit der äusseren Akrosomenmembran entstehenden submikroskopischen Öffnungen akrosomaler Inhalt entweicht. Im Gegensatz dazu definierte er die ähnlichen Erscheinungen der "falschen Akrosomenreaktion" als das Vorkommen nicht spezifischer Degeneration der Spermien. Die physiologische Bedeutung dieses Geschehens liegt nach Ansicht von AUSTIN und BISHOP (1958a), AUSTIN (1969), BEDFORD (1970) und HADEK (1963) in der Bereitstellung von Enzymen, die während der Befruchtung die Penetration der Samenzellen durch die Eihüllen ermöglichen.

2.3.3. Untersuchung der morphologischen Beschaffenheit des Akrosoms

Fertilitätsstörungen und Sterilität von Bullen (HANCOCK, 1953; SAACKE et al., 1968) und Ebern (BUTTLE und HANCOCK, 1965; NICANDER und BANE, 1966; WOHLFAHRT, 1961; LIESS und KRAUSE, 1958) waren mit lichtoptisch wahrnehmbaren Alterationen und Missbildungen des Akrosoms verbunden. Die routinemässige Beurteilung der Akrosomenmorphologie bot in diesem Zusammenhang eine zusätzliche Möglichkeit, Informationen über den für die Befruchtung bedeutsamen Abschnitt der Samenzellen zu erlangen.

Das Akrosom lebender Zellen ist an fixierten, mit verschiedenen Färbungsmethoden (Giemsa, Nigrosin) behandelten Eberspermien als ein, dem apikalen Rand des Spermienkopfes anliegendes, konvex geformtes, scharf begrenztes sichelförmiges Gebilde sichtbar, das bei abgestorbenen oder vorher abgetöteten Spermien die scharfen und deutlichen Markierungen verliert, anschwillt oder teilweise vom Kopf abgelöst ist (HANCOCK, 1956). Die zwischen diesen beiden Extremen liegenden, an fixierten und gefärbten (Giemsa) Präparaten erkennbaren Veränderungen, bestehen je nach Ausmass einer auf die Zelle einwirkenden Noxe aus Anschwellungen, Vesikularisierungen und Lageveränderungen der Akrosomen (BOENDER, 1968).

Die Beurteilung ungefärbter, unfixierter, mit Natriumfluorid oder gepufferter Formolsalzlösung immobilisierter Eber- und Bullenspermien (PURSEL et al., 1972a; CRABO und GRAHAM, 1972) über Phasenkontrastmikroskopie erlaubte eine feinere morphologische Typendifferenzierung der Akrosomen. Mit dieser Methode können die durch Fixierung und Färbung der Sper-

mien häufig bedingten Artefakte ausgeschlossen werden. Ausgehend von intakten Spermien mit im Phasenkontrast sichtbaren scharf begrenzten, eng am Kopf anliegenden, sichelförmigen Kappen (Akrosom) treten je nach Schwere einer Schädigung Verdickungen, Unregelmäßigkeiten der Begrenzung und verschiedene Grade der Lockerung bis hin zur völligen Ablösung des Akrosoms auf. Diese Schäden werden für die praktische Beurteilung meist in drei bis fünf Gruppen (GRAHAM et al., 1971a; HILLMANN und TREU, 1973; BOEHNKE et al., 1974; CRABO et GRAHAM, 1972; PURSEL et al., 1972a) klassifiziert.

Ähnliche Strukturschäden werden auch an ungefärbten und unfixierten Bullenspermien beobachtet (SAACKE und MARSHALL, 1968), wobei aber von den Autoren, wie schon früher von HANCOCK (1953), hervorgehoben wird, dass Alterationen der Akrosomen nur bei unbeweglichen und toten Spermien zu finden sind und motile Zellen eine intakte Kopfkappe besitzen. Bei Eberspermien werden - konträr zu diesen Feststellungen - leichte und schwere Strukturveränderungen auch an Akrosomen beweglicher Zellen beobachtet. Die bereits erwähnten Untersuchungen von GRAHAM et al. (1971a) zeigen, dass der während der "Wartezeit" entstehende Schutz der Spermien durch Seminalplasmaproteine (Coating-Effekt) neben einer Senkung des extrazellulären GOT-Gehaltes gleichzeitig auch eine Steigerung des Prozentsatzes morphologisch intakter Akrosomen bewirkt.

Einen ähnlichen Effekt erzielten PURSEL et al. (1972a,b, 1973a,b), die durch mehrstündige Lagerung von Eberspermien bei +15°C, gemessen an der Anzahl

normaler Kopfkappen, die Kälteschockresistenz erhöhen konnten. Im Gegensatz zu GRAHAM et al. (1971a) führen sie diese Auswirkung der "Wartezeit" nicht auf eine äusserliche Schutzwirkung durch den "Coating-Effekt", sondern auf ein spermieneigenes Vermögen zurück. Diese Fähigkeit ist bei Samenzellen der spermiereichen Fraktion deutlich, bei den Spermien eines vollständigen Ejakulates in wesentlich geringerem Masse ausgebildet (PURSEL et al., 1972a). Sie wird durch hohe Verdünnungsraten (PURSEL et al., 1973a, 1972a) und durch die Zusammensetzung einiger gebräuchlicher Tiefgefrierverdünner negativ beeinflusst (PURSEL et al., 1972a,b,c, 1973b, 1974).

Durch die morphologische Begutachtung der Akrosomen und die Bestimmung des extrazellulären GOT-Gehaltes konnten geeignete Verdünnungs- und Auftaumedien sowie Gefrier- und Auftautechniken entwickelt werden, die eine Reduzierung der durch den Tiefgefrierprozess hervorgerufenen Spermienschädigungen ermöglichen (GRAHAM et al., 1971a; PURSEL et al., 1972c; PURSEL und JOHNSON, 1971a,b; 1974a,b; HILLMANN und TREU, 1973; BOEHNKE et al., 1974; ROMENEY et al., 1974a,b,c).

Die Bestimmung der Akrosomenmorphologie konnte jedoch nicht als verlässliches Kriterium für das Befruchtungsvermögen einzelner Ejakulate verwendet werden. Zwar waren starke Alterationen der Akrosomen mit einer erheblichen Reduzierung des Befruchtungsvermögens flüssig konservierter Spermien verbunden (PURSEL et al., 1972c), für tiefgefrorenes Sperma aber bestanden keine gesicherten Beziehungen

zwischen Befruchtungsergebnissen und Morphologie der Akrosomen (WILMUT und POLGE, 1971; BOEHNKE et al., 1974). Ebenso war zwischen dem Prozentsatz motiler oder unbeweglicher Zellen nach dem Auftauen und intakter bzw. alterierter Kopfkappen keine Korrelation festzustellen (HILLMANN und TREU, 1973; BOEHNKE et al., 1974; ROMENY et al., 1974a,b; CRABO und GRAHAM, 1972).

Statistisch gesicherte Abhängigkeiten konnten dagegen zwischen dem GOT-Aktivitätsverlust der Spermien und dem Prozentsatz intakter oder geschädigter Kopfkappen (HILLMANN und TREU, 1973; CRABO und GRAHAM, 1972) gefunden werden. Beziehungen zwischen der extrazellulären GOT-Aktivität und der Bewegungsaktivität (BOEHNKE et al., 1974) sowie zwischen Kopfkappenmorphologie und Bewegungsaktivität bestanden jedoch nicht.

2.3.4. Enzymausstattung des Akrosoms

Aufgrund des Vorkommens lysosomaler Enzyme kann das Akrosom als ein spezialisiertes Lysosom bezeichnet werden. Unter anderem wurden in Akrosomenextrakten Arylsulphatase, saure Phosphatase und Phospholipase A gefunden (ALLISON, 1967; ALLISON und HARTREE, 1970; PEDERSEN, 1972). Neben diesen lysosomalen Enzymen konnten in Akrosomen von Goldhamster-, Kaninchen- und Bullenspermien Hyaluronidase (ALLISON und HARTREE, 1970; ZANEVELD et al., 1973) und Neuraminidase, ein Corona penetrating enzyme (CPE,

ZANEVELD und WILLIAMS, 1970) sowie eine trypsin-ähnliche Protease lokalisiert werden (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1968, 1969; ZANEVELD et al., 1969; ZANEVELD und POLAKOSKI, 1971; POLAKOSKI et al., 1972a; HO und MEIZEL, 1970; MULTAMÄKI und NIEMI, 1972). Bei der Penetration der Samenzelle in das Ei wirkt die Hyaluronidase auf die äusserste Eihülle, den Cumulus oophorus, das CPE und die Neuraminidase auf die Corona radiata und die trypsin-ähnliche Protease auf die innerste Eihülle, die Zona pellucida, ein.

2.3.5. Akrosin

KARG et al. (1964) konnten zum erstenmal nachweisen, dass Bullenspermien ein proteolytisches Enzym besitzen, das synthetische Substrate für Trypsin hydrolisiert. Mit zellfreien, aus einem Lipoglykoproteinkomplex bestehenden Akrosomenextrakten konnten der Cumulus oophorus, die Corona radiata und in einigen Fällen teilweise auch die Zona pellucida frisch ovulierter Kanincheneier zerstört werden (SRIVASTAVA et al., 1965). STAMBAUGH und BUCKLEY (1968) waren in der Lage, mit einem homogenen, lyophilisierten Extrakt aus Kaninchenakrosomen innerhalb kurzer Zeit ohne Beschädigung des Vitellus die Zona pellucida vollkommen aufzulösen. Da der von ihnen gewonnene Lipoglykoproteinkomplex ein dem Trypsin ähn-

liches pH-Optimum bei der Spaltung synthetischer Substrate aufwies und durch natürlich vorkommende Trypsininhibitoren vollständig gehemmt werden konnte (STAMBAUGH et al., 1969), war nach Ansicht der Autoren ein trypsin-ähnliches Enzym für die Auflösung der Zona pellucida verantwortlich, welches nach den Ergebnissen neuerer Arbeiten auf der inneren Akrosomenmembran lokalisiert ist (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1972a; BROWN und HARTREE, 1974; SCHILL und WOLFF, 1974a,b; MULTAMÄKI, 1973; SRIVASTAVA et al., 1974). Für diese trypsin-ähnliche akrosomale Protease wurde von ZANEVELD et al. (1971b) der Name Akrosin vorgeschlagen.

2.3.5.1. Charakterisierung von Akrosin

Die enge Verwandtschaft von Akrosin mit Trypsin ist durch folgende, für beide Enzyme gemeinsame Eigenschaften belegt:

- pH-Optimum von 8,0 bei der Spaltung synthetischer Trypsinsubstrate wie BAEE*, BAPA*, BLNA* und TAME* (ZANEVELD et al., 1972a; SCHIESSLER et al., 1972; FINK et al., 1972; STAMBAUGH und BUCKLEY, 1972b)

- Hydrolytische Spaltung von

Azocasein	(SCHIESSLER et al., 1972; ZANEVELD et al., 1972a)
-----------	---

-
- * BAEE (N-Benzoyl-L-arginin-äthylester)
 - * BAPA (N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid)
 - * BLNA (N-Benzoyl-L-lysin-p-nitroanilid)
 - * TAME (N-Tosyl-L-arginin-äthylester)

Ribonuclease (ZANEVELD et al., 1972a; FRITZ et al., 1975)

Fibrinogen (ZANEVELD et al., 1972b)

Gelatine (ZANEVELD et al., 1972b)

- Hemmung durch folgende synthetische Inhibitoren:

DFP (Diisopropylfluorophosphat) und

TLCK (N-Tosyl-lysyl-chlormethyl-keton)

(SCHIESSLER et al., 1972; ZANEVELD et al., 1972a,b;

POLAKOSKI et al., 1972b)

- Hemmung durch Benzamidin (SCHIESSLER et al., 1972)

- Kininfreisetzung (PALM und FRITZ, 1975)

Weiter stellt das Eberakrosin, was seine Hemmbarkeit durch Protein-Proteinase-Inhibitoren (FRITZ et al., 1972a,b,c) betrifft, ähnlich wie Trypsin und Plasmin eine Proteinase dar, die durch ein breites Wirkungsspektrum gekennzeichnet ist. Einen zusätzlichen Beweis für die enge Verwandtschaft von Akrosin und Trypsin sehen FRITZ et al. (1972c,d) in der Tatsache, dass auch trypsinspezifische Inhibitoren aus Bauchspeicheldrüsen die akrosomale Protease Akrosin zu hemmen vermögen.

Nachdem aus Kaninchen-, Human- und Eberspermien (POLAKOSKI et al., 1972a,b; ZANEVELD et al., 1972a,b; FRITZ et al., 1972e,d; FINK et al., 1972; SCHIESSLER et al., 1972) Akrosin isoliert wurde, konnten SCHLEU-
NING et al. (1973) erstmals stabiles, hochgereinigtes Akrosin aus Eberspermien darstellen. Elektrophoretische Untersuchungen wiesen für hochgereinigtes Akro-

sin aus frischen Ejakulaten bei pH 4,8 im wesentlichen eine Proteinfraction auf, deren Molekulargewicht mit ca. 38 000 ermittelt wurde (FRITZ et al., 1975). Bei Akrosinisolaten aus gelagerten bzw. verdünnten und gefrorenen Ejakulaten bestanden neben dieser Hauptfraktion zwei Nebenfraktionen mit einem Molekulargewicht von 37 000 und 34 000 bzw. 2 bis 4 Fraktionen mit Molekulargewichten von 10 000 bis 25 000 (SCHLEUNING und FRITZ, 1974). POLAKOSKI und WILLIAMS (1974) und POLAKOSKI et al. (1973) bestimmten dagegen für ihre Eberakrosinextrakte ein Molekulargewicht von 30 000. Das Vorkommen solcher multipler Akrosinfraktionen (GARNER, 1973; GARNER und CULLISON, 1974) auch für Bullenakrosin sowie die von SCHILL (1973a) bei gewaschenen Humanspermien beobachteten Akrosinaktivierungen werden von FRITZ et al. (1975) dahingehend erklärt, dass das Akrosin durch eine begrenzte proteolytische Spaltung eines inaktiven Proenzym's höheren Molekulargewichtes freigesetzt wird. Diese Vorstellung wird durch die neueren Untersuchungen von MEIZEL und HUANG-YANG (1973), MEIZEL et al. (1974), HUANG-YANG und MEIZEL (1975) sowie POLAKOSKI (1974) bekräftigt, die aus Kaninchen- und Eberspermien ein Proakrosin darstellten, das durch Ca-Ionen und Pankreastrepsin aktiviert wird (POLAKOSKI, 1974).

2.3.5.2. Biologische Funktion des Akrosins

Da die Zona pellucida enzymatisch nur durch Trypsin

oder das trypsinähnliche Akrosin aufgelöst wird (GWATKIN et al., 1973; PAVLOK und McLAREN, 1972; ZANEVELD et al., 1969, 1972a) und natürliche sowie synthetisch hergestellte Trypsininhibitoren diese Auflösung durch Akrosomenextrakte verhindern (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1968, 1969; ZANEVELD et al., 1971a) bzw. einschränken (FRITZ et al., 1971; ZANEVELD et al., 1971a), kann angenommen werden, dass die Hauptaufgabe der im Akrosom der Spermien lokalisierten trypsin-ähnlichen Protease Akrosin die Auflösung der Zona pellucida ist.

Eine weitere Aufgabe im Befruchtungsprozess wird dem Akrosin im Zusammenhang mit der Entstehung des Polyspermieblocks zugeschrieben (HARTMANN und GWATKIN, 1971; CONRAD et al., 1971; FRITZ et al., 1972f). Nach Kontakt des ersten Spermiums mit der Eizelle werden akrosinsensible Rezeptoren der Zona pellucida durch das Akrosin der Samenzelle blockiert, so dass sich die nachfolgenden Spermien nicht mehr anheften können und dadurch eine Polyspermie verhindert wird.

Neben diesen Funktionen kann nach Ansicht von SCHUMACHER und ZANEVELD (1974) und NAKAMURA (1974) durch Akrosin der Aufstieg der Spermien im weiblichen Genitale über Verflüssigung des Cervicalschleimes und die Verbesserung der auch von SCHILL und HABERLAND (1974) beobachteten Bewegungsaktivität der Samenzellen durch Kininfreisetzung erleichtert werden.

2.3.5.3. Akrosinaktivitätsbestimmung im klinisch-diagnostischen Bereich

Mit dem bisher zur Herstellung akrosomaler Extrakte bevorzugt verwendeten detergentienhaltigen schwach basischen Lösungen (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1969, 1970; POLAKOSKI et al., 1972a; ZANEVELD et al., 1972a; ALLISON und HARTREE, 1970; TEICHMANN und BERNSTEIN, 1971) gelang zwar die Messung der Akrosinaktivität aus epididymalen und kapazitierten (ZANEVELD et al., 1969), nicht aber aus ejakulierten Spermien (ZANEVELD et al., 1972b), da bei diesen das Akrosin gebunden in einem Akrosin-Inhibitor-Komplex vorlag.

Durch die von FINK et al. (1972), FRITZ et al. (1972e) und SCHILL (1973a) entwickelte Methode der sauren Extraktion (pH 1,8 - 2,7) des Akrosins aus Eber- und Humansperma, bei der eine vollständige Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes stattfindet, gelang mit Hilfe geeigneter Substrate in einem kombinierten Testsystem die Bestimmung des aktuellen Enzymstatus auch von Einzelejakulaten.

SCHILL (1974 b), SCHIRREN und EWEIS (1973) fanden statistisch gesicherte Abhängigkeiten zwischen extrahierbarer Akrosinaktivität und Spermiedichte in menschlichen Ejakulaten. Untersuchungen von SCHILL (1973a) und SCHIRREN et al. (1974) ergaben weiter, dass rundköpfige Spermien, die infolge des fehlenden Akrosoms nicht befruchtungsfähig sind, keine messbaren Akrosinaktivitäten aufwiesen. Darüber hinaus stellten SCHILL (1973b) und SCHILL und WOLFF (1974b) eine Beeinflussung des extrahierbaren Akrosins im Verlaufe kryobiologischer Behandlung von Human-

spermien im Zusammenhang mit der Verwendung von Glycerin als Gefrierschutzmittel fest: Nach Zusatz von 10 % Glycerin bzw. eines glyzerinhaltigen Eidotterverdünners (7,5 % Glycerin) stieg die Aktivität im Vergleich zu der von unbehandeltem Sperma signifikant an; nach dem Auftauen des glyzerinisierten Spermas wurden erniedrigte Werte gemessen, die sich jedoch nicht signifikant von denen des Nativspermas unterschieden (SCHILL, 1973b). Die Aktivität des verdünnten Spermas (Eidotter + Glycerin) war gegenüber der des Nativspermas signifikant erniedrigt.

WENDT (1974) konnte eine Beeinflussung der Akrosinaktivität von Bullensperma durch unterschiedliche Deckbeanspruchung und Lagerung sowohl im Einzel ejakulat als auch in einzelnen Samenzellen (Gelatinolyse) feststellen. Häufige Desemination (5mal täglich) führte zu einer Abnahme der Akrosinaktivität. Ebenso bewirkte eine Lagerung der Ejakulate bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C über mehrere Tage hinweg einen hohen Verlust der Akrosinaktivität. Ejakulate, die unverdünnt bei -20°C gelagert wurden, wiesen nach dem Auftauen keine Enzymaktivitäten mehr auf.

Anhand von Messungen des mit detergentienhaltigen Lösungen extrahierten Akrosins konnten JOHNSON et al. (1974) eine starke Reduzierung der Akrosinaktivität tiefgefrorener Eberspermien feststellen. Durch Zusatz eines eidotterhaltigen Tiefgefrierverdünners zu Ejakulaten konnten diese Verluste vermindert werden.

Die Ergebnisse der oben erwähnten Arbeiten zeigen,

dass die Bestimmung des Akrosinstatus neben den bisher gebräuchlichen Beurteilungsmethoden wichtige Informationen im klinisch-diagnostischen Bereich liefern können.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Versuchstiere und Versuchsanordnung

Als Versuchstiere standen drei Eber der deutschen Landrasse im Alter von 1,5 bis 3 Jahren zur Verfügung. Die spermienreiche Fraktion von je 6 Ejakulaten pro Eber, in regelmässigen Abständen von 2 - 3 Tagen gewonnen, wurde mit einer nach GRAHAM et al. (1971a) modifizierten Technik auf Trockeneis tiefgefroren (Pelletmethode).

Anhand der aus den Spermien extrahierbaren trypsinähnlichen Protease Akrosin, der im Seminalplasma messbaren GOT-Aktivität sowie durch quantitative Beurteilung der Akrosomenmorphologie erfolgte die Überprüfung der Auswirkung des Tiefgefrierens auf Eberspermien.

3.1.1. Versuchsaufbau

Um festzustellen, welchen Einfluss

- a. die vor der Pelletierung stattfindende Abkühlung des Spermas von $+38^{\circ}\text{C}$ auf $+5^{\circ}\text{C}$ innerhalb von drei Stunden,
- b. steigende Glyzerinkonzentrationen im Tiefgefrierverdünner bzw. alleiniger Zusatz von Glyzerin zum Sperma und

c. unterschiedliche Auftaumethoden

auf das akrosomale System (Messung der Akrosinaktivität und Bestimmung der Akrosomenmorphologie) bzw. auf die Zellmembranen (GOT-Aktivität) besitzen, wurde folgende, in der Abb. 1 schematisch dargestellte, Versuchsanordnung innerhalb der Tiefgefrierkonservierung gewählt.

Während der vierstündigen Abkühlung vor der Tiefgefrierung (Pelletierung) wurde der Einfluss der Temperatursenkung auf die drei Parameter an nativen, mit 2 % Glycerin (Endkonzentration) versetzten und verdünnten Spermaproben, die nach Erreichen der Temperaturstufen $+15^{\circ}\text{C}$ und $+5^{\circ}\text{C}$ entnommen worden waren, überprüft.

Um Temperaturschwankungen während der Abkühlung des Spermas auf $+5^{\circ}\text{C}$ zu verhindern, wurden die nach der einstündigen Lagerung bei $+22^{\circ}\text{C}$ behandelten Ejakulate (siehe Abb. 1) nochmals in entsprechende Portionen aufgeteilt, die für die Entnahme und Untersuchung bei $+15^{\circ}\text{C}$ und $+5^{\circ}\text{C}$ sowie die Tiefgefrierung bestimmt waren.

Als Kontrolle dienten die bei $+38^{\circ}\text{C}$ durchgeführten Untersuchungen des Nativspermas und der sofort nach der Gewinnung mit einem Tiefgefrierverdünner vermischten Ejakulate.

Das Nativsperma wurde zusätzlich bei $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ sowie nach dem Auftauen untersucht.

Der Einfluss unterschiedlicher Glycerinkonzentrationen auf Eberspermien wurde mit Verdünnern, die 2,

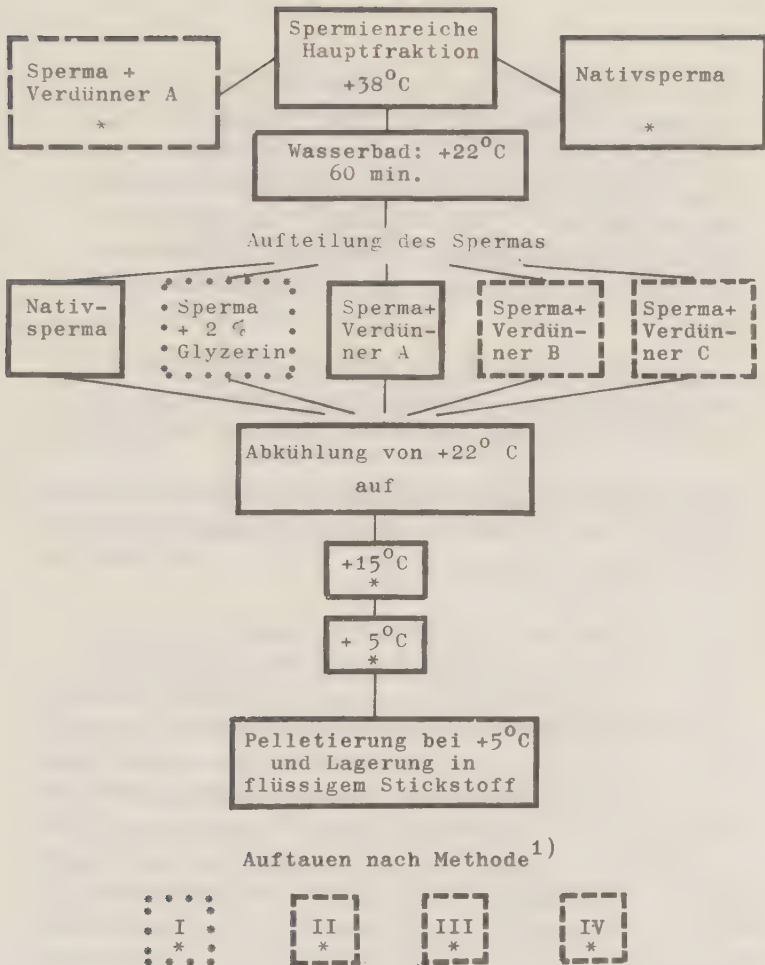


Abb. 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSUCHSANORDNUNG

* = Bestimmung der GOT- und Akrosinaktivität sowie des Prozentsatzes morphologisch geschädigter Akrosomen

1) = Auftaumethode siehe Seite 46

- = Untersuchungen in beiden Versuchsreihen
- ... = Untersuchungen nur in der ersten Versuchsreihe
- = Untersuchungen nur in der zweiten Versuchsreihe

4 bzw. 6 % Glyzerinendkonzentration bei einem Verdünnungsverhältnis von 1 Teil Sperma + 2 Teile Verdünner ergaben, überprüft. Die Verdünnung erfolgte nach der einstündigen Aufbewahrung des Nativspermas bei $+22^{\circ}\text{C}$. Wie das Nativ- bzw. glyzerinierte Sperma wurden die verdünnten Spermaproben bei $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ und nach dem Tiefgefrieren untersucht.

Die tiefgefrorenen Proben wurden mit vier unterschiedlichen Methoden aufgetaut (siehe Seite 46) und anhand der oben erwähnten Parameter überprüft.

Wegen der Arbeitsaufwendigkeit der einzelnen Untersuchungsschritte musste der Gesamtversuch unterteilt werden (siehe Abb. 1):

Teil 1: Hier erfolgte die Bestimmung der drei Parameter an Nativsperma bei $+38^{\circ}\text{C}$, $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ und nach dem Tiefgefrieren. Mit Ausnahme des ersten Messpunktes ($+38^{\circ}\text{C}$) wurde glyzerinisiertes (2 % Glyzerinendkonzentration) und mit einem Tiefgefrierverdünner A (2 % Glyzerinendkonzentration) vermisches Sperma bei den oben angeführten Temperaturstufen entnommen und untersucht. Das Auftauen dieser Proben erfolgte nach der Methode I (siehe Seite 46).

Teil 2: Wie in Teil 1 wurden zur Kontrolle Messungen der frisch ejakulierten Spermien bei $+38^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Zusätzlich wurden hier noch die Parameter an sofort nach der Gewinnung mit Verdünner A versetzten Ejakulaten

(+38°C) überprüft. Die Entnahme und Weiterverarbeitung der mit den Verdünnern A, B und C (2 , 4 und 6 % Glyzerinendkonzentration) versetzten Spermaproben erfolgte wie im ersten Versuchsabschnitt bei +15°C, +5°C sowie nach dem Auftauen der Pellets nach den Methoden II, III und IV (siehe Seite 46).

Sowohl in Versuchsteil 1 als auch in Versuchsteil 2 wurde nach jeder Probenentnahme die Spermienanzahl/mm³ bestimmt.

Jede Versuchsserie wurde im split sample-Verfahren mit je drei Ejakulaten von drei Ebern/Versuchsreihe durchgeführt.

3.1.2. Gewinnung und Untersuchung der Ejakulate

Die Eber wurden mit einer künstlichen Scheide (AAMDAL et al., 1958) am Phantom fraktioniert deseminert. Als Versuchsmaterial fand nur die nicht mit dem Sekret der Bulbourethraldrüsen (Gel) vermengte spermienreiche Fraktion Verwendung. Nach der Gewinnung wurden die Ejakulate auf folgende Kriterien hin überprüft:

- Makroskopisch:
- Volumen
 - Farbe
 - Konsistenz

Mikroskopisch: - Spermienanzahl/mm³
(Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK)
- Motilität
(Phasenkontrastmikroskop,
bei +38°C)

Chemisch-
physikalisch: - pH-Wert (Indikatorpapier)

3.1.3. Verdünnungs- und Auftaumedien

3.1.3.1. Zusammensetzung und Herstellung des Tiefgefrierverdünners

Für die Verdünnung der Ejakulate wurde der von GRAHAM et al. (1971a) beschriebene Tiefgefrierverdünner in modifizierter Form verwendet.

Neben Glyzerin als Kryoprotektivum wurde der eidotterhaltigen Pufferlösung (TES und Tris) Natriumlaurylsulfat (Orvus Es Paste; PROCTER & GAMBLE), das als oberflächenaktive Substanz zusätzliche Schutzwirkung vor Tiefgefrierschäden erbringt, zugefügt. Der Tiefgefrierverdünner hatte folgende Zusammensetzung: (1)

N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2	
-aminoäthan-sulfonsäure (TES)	4,8 g
Tris-(hydroxymethyl)-aminoäthan (Tris)	1,1 g
Fruktose	0,2 g
Streptomycin	0,1 g
Penicillin	50 000 IE
Aqua dest. ad	100,0

(2)

Eidotter

(3)

Glyzerin 1,2 ml

Orvus Es Paste (Natriumlaurylsulfat) 0,3 ml

- 80 Teile von Lösung (1) und 20 Teile des Eidotters (2) wurden vermischt und 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Nur der Überstand wurde weiter verwendet.

- 38,5 Teile des Überstandes und Lösung (3) stellten den gebrauchsfertigen Tiefgefrierverdünner A dar, der bei einem Verdünnungsverhältnis von 1 Teil Sperma + 2 Teile Verdünner 2 % Glyzerin in Endkonzentration enthielt.

- Bei den Verdünnern B und C wurde die Zusammensetzung des Verdünners A hinsichtlich der Glyzerinmenge und des Anteils der Lösung (1) so verändert, dass 4 und 6 % Glyzerinendkonzentration vorhanden war.

	Verdünner B	Verdünner C
Überstand von Lösung (1)+(2)*	37,3 ml	36,1 ml
Glyzerin = Lösung (3)	2,4 ml	3,6 ml
Orvus Es Paste	0,3 ml	0,3 ml

* Mischungsverhältnis wie bei Verdünner A

3.1.3.2. Auftauelösung

Die Auftauelösung wurde nach den von NAGASE et al. (1964b) veröffentlichten Grundlagen hergestellt.

(1)	Natriumzitrat . 2H ₂ O	7,9 g
	Natriumkarbonat	0,38g
	Kaliumkarbonat	0,43g
	Glukose	13,5 g
	Sulfanilamid	0,5 g
	Dihydrostreptomycin	1,0 g
	Penicillin G	1 Mill. IE
	Aqua dest. ad	500,0
(2)	Moliko	
	(Magermilchpulver der Fa. NESTLÉ, Lindau/Bodensee)	50,0 g
	Aqua dest. ad	500,0

Lösung (1) und (2) wurden im Verhältnis 1:1 vermischt, mit 5 %-iger Zitronensäure auf pH 7,0 eingestellt und bei -20°C bzw. in 0,1 ml-Pellets bei -196°C aufbewahrt.

3.2. Methoden

3.2.1. Tiefgefrierkonservierung (modifiziert nach GRAHAM et al., 1971a)

Die spermienreiche Fraktion der Ejakulate wurde unmittelbar nach der Gewinnung 1 Stunde lang in einem Wasserbad ($+22^{\circ}\text{C}$) zur Erzielung des "Coating-Effekts" (GRAHAM et al., 1971a) aufbewahrt. Die Mischung mit dem vorgesehenen Tiefgefrierverdünner ($+22^{\circ}\text{C}$) erfolgte danach portionsweise im Verhältnis 1:2 (1 Teil Sperma und 2 Teile Verdünner) unter ständigem Schwenken. Das verdünnte Sperma wurde in ein Wasserbad gestellt ($+22^{\circ}\text{C}$) und im Kühlschrank in 3 Stunden auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Die Kühlgeschwindigkeit wurde mit einem automatischen Temperaturschreiber überwacht. Im Durchschnitt erreichte das Sperma nach 50 Minuten $+15^{\circ}\text{C}$ und nach 100 Minuten $+10^{\circ}\text{C}$ und die Endtemperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ nach 180 Minuten.

Das auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlte Sperma wurde auf CO_2 -Eis-scheiben pelletiert (Pelletvolumen = 0,2 ml) und nach 3 - 4 Minuten in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt und gelagert.

3.2.2. Auftaumethoden

Mit vier Auftaumethoden wurde der Einfluss unterschiedlicher Auftaugeschwindigkeiten auf die gefrierkonservierten Spermien untersucht.

Methode I: In einem Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$ wurden 2,5 ml Auftaulösung in einem dünnwandigen Reagenzglas erwärmt. 10 - 15 Pellets wurden darin einzeln aufgetaut, wobei die Temperatur der Lösung nicht unter $+35^{\circ}\text{C}$ absank.

Methode II: Gleiches Prinzip wie Methode I; 10 - 15 Pellets wurden jedoch gleichzeitig unter ständigem Schwenken aufgetaut. Die tiefste Temperatur dieses Gemisches betrug während des 35 - 40 Sekunden dauernden Auftauprozesses durchschnittlich $+19^{\circ}\text{C}$.

Methode III: Pelletierte Auftaulösung mit einem Gesamtvolumen von 2,5 ml und 10 - 15 Spermienpellets wurden vermischt, in ein Reagenzglas gefüllt und in einem Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 2-3 Minuten aufgetaut.

Methode IV: Entspricht Methode II; jedoch wurden folgende Punkte modifiziert:

Die Temperatur des Wasserbades betrug $+60^{\circ}\text{C}$. Unter Kontrolle eines Temperaturschreibers wurde das Gemisch bei Erreichen von $+38^{\circ}\text{C}$ (innerhalb 11-12 Sekunden) in ein zweites Wasserbad überführt ($+40^{\circ}\text{C}$). Die tiefste Temperatur bei dieser Methode betrug durchschnittlich $+29^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Photometrische Akrosinbestimmung (modifiziert nach FINK et al., 1972)

3.2.3.1. Gewinnung der Spermienextrakte

1 ml des zu messenden Spermas wurde in 5 ml physiologische Kochsalzlösung suspendiert, 20 Minuten bei 600 g und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 5,0 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert.

Nach fünfmaliger Wiederholung dieses Arbeitsganges mit jeweils 10 Minuten Zentrifugationsdauer wurde das Spermiesediment mit 4 ml 2%-iger Essigsäure, die durch Zugabe von 2n HCl auf pH 2,2 eingestellt worden war, resuspendiert und 120 Minuten bei Zimmertemperatur gelagert. Während dieser Zeit dissoziierte der Akrosin-Inhibitor-Komplex, so dass Akrosin frei vorlag.

Anschliessend erfolgte bei +4°C eine Zentrifugation über 30 Minuten mit 1000g. Der essigsaure Überstand (Akrosomenextrakt) wurde bis zur photometrischen Aktivitätsbestimmung im Kühlschrank gelagert. Da Akrosin an Glasoberflächen adsorbiert wird, wurden für alle Arbeitsschritte Plastikgefässe verwendet.

3.2.3.2. Quantitative photometrische Bestimmung der Akrosinaktivität

Die Akrosinaktivität der Spermienextrakte wurde in

einem kombinierten Testsystem mit Alkoholdehydrogenase (ADH) und Nikotinamid-dinucleotid (NAD) über die Spaltung des synthetischen Trypsinsubstrates BAEE (Benzoyl-L-argininäthylester) gemessen.

Das bei der Hydrolyse von BAEE durch Akrosin freigesetzte Äthanol wurde dabei mit Hilfe von NAD und ADH photometrisch bestimmt (Photometer der Fa. EPPENDORF; Filter: Hg 366 nm).

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

BAEE (N-Benzoyl-L-argininäthylester); 10mg/10ml H₂O
ADH (Alkoholdehydrogenase)
NAD (Nicotinamid-adenin-dinucleotid); 20mg/ 1ml H₂O

Pyrophosphatpuffer: Natriumpyrophosphat 15,2 g
Semicarbacid 4,1 g
Glycin 0,9 g
Aqua dest. ad 500,0
Einstellung auf pH 8,7
mit 1 N NaOH

Während der Messung wurden alle Reagenzien in einem Eisbad aufbewahrt. Die Zugabe des Akrosins in die Messansätze erfolgte mit automatischen Plastikpipetten (Mikrolitersystem EPPENDORF). In je sechs Plastikküvetten wurden pro Messansatz folgende Reagenzien eingebracht:

2,30 - 2,39 ml Pufferlösung (je nach eingesetzter Menge des Akrosomenextraktes)

ADH 0,02 ml

BAEE 0,5 ml

NAD 0,1 ml

Das Endvolumen/Küvette
betrug 3 ml.

Diese Messansätze wurden gut gemischt und 5 Minuten bei $+25^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschliessend wurden 5 davon mit dem Akrosomenextrakt versetzt, der 6. diente als Leerwert (Substratansatz ohne Akrosin). Die Menge des Akrosomenextraktes wurde so bemessen (0,01 bis 0,1 ml), dass der Extinktionszuwachs/Min (ΔE) nicht mehr als 0,01 betrug. Wurde dieser Wert auch bei geringster Einsatzmenge überschritten (0,01 ml), musste der ursprüngliche Akrosomenextrakt entsprechend mit 2 %-iger Essigsäure nachverdünnt werden. Nach 2 Minuten Inkubation des Akrosin-Substrat-Gemisches erfolgte die Messung des Extinktionszuwachses jeweils nach 1 Minute über einen Zeitraum von 10 Minuten. Messbedingungen in den 6 Küvetten: $+25^{\circ}\text{C}$; pH 8,7.

Unter Einbeziehung des Leerwertes (Substratansatz ohne Akrosin) konnte die Aktivität in den 5 Küvetten mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors (0,0011) errechnet werden. 1 mU Akrosin entspricht bei der Spaltung von BAEE/ADH einer Extinktionsänderung ΔE von 0,0011/Min..

Die Berechnung der Akrosinaktivität erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsverhältnisse und der Einsatzmenge des Akrosomenextraktes:

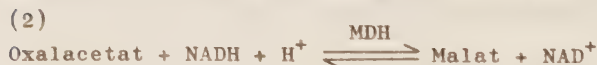
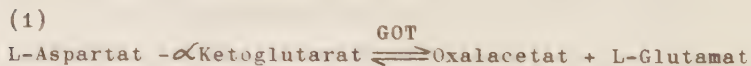
$$\frac{\text{Extinktionszuwachs} \Delta E \text{ Probe/Min.} - \text{Extinktionszuwachs} \Delta E \text{ Leerwert/Min.}}{\text{Faktor (0,0011)}}$$

x ml Essigsäure zur Extraktion des Akrosins
x ml Essigsäure zur Nachverdünnung
x ml Einsatzmenge des Extraktes, bezogen auf 1 ml
= mU Akrosin / ml Sperma

Zur Standardisierung wurde die errechnete Akrosinaktivität in mU/ml unter Einbeziehung der Spermien-dichte/mm³ auf eine Aktivität in mU/10⁸ Spermien umgerechnet.

3.2.4. Quantitative photometrische Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Die von den Spermien in das Seminalplasma abgegebene GOT-Aktivität (extrazelluläre GOT-Aktivität) wurde nach der Methode vom KARMEN (1955) mit dem UV-GOT-Mono-Testsystem der Fa. BOEHRINGER gemessen. 1 ml der jeweils zu untersuchenden Spermaprobe wurde 15 Minuten bei 600 g zentrifugiert und die Aktivität von 0,5 ml des weitgehend zellfreien Überstandes innerhalb von 2 Stunden mit einem Photometer der Fa. EPPENDORF bestimmt. Als Substrat für die GOT dienten L-Aspartat und α -Ketoglutarat in Kombination mit Malatdehydrogenase (MDH) als Indikatorenzym. Der Reaktionsablauf besteht aus 2 enzymatischen Umsetzungen (BERGMEYER, 1970):



Die Aktivität der GOT wird über die Geschwindigkeit der durch Reaktion (2) hervorgerufenen NADH-Abnahme photometrisch bestimmt. Für den Bestimmungsansatz wurde der Inhalt einer Monotestflasche mit 3 ml Aqua bidest. (+25°C) aufgelöst, mindestens 2 Minuten

inkubiert und anschliessend mit 0,5 ml des Überstandes versetzt. Diese Lösung wurde in eine Glasküvette gegossen (Schichtdicke 1 cm) und der Extinktionsabfall bei einer Messstrahlung von 366 nm und +25°C (thermokonstanter Küvettenhalter) nach 1 Minute und nach weiteren 1, 2 und 3 Minuten abgelesen. Aus den drei Messungen $\Delta E/\text{Min.}$ wurde der Mittelwert gebildet und in folgenden Berechnungen eingesetzt (Arbeitsanleitung der Fa. BOEHRINGER):

$$2121(\text{Hg } 366\text{mm}) \times \Delta E/\text{Min.} = \text{mU GOT-Aktivität/ml Spermien}$$

Zur Standardisierung erfolgte analog der Berechnung der Akrosinaktivität unter Berücksichtigung der Spermiedichte/ mm^3 eine Umrechnung der extrazellulären GOT-Aktivität auf $\text{mU}/10^8$ Spermien.

Betrugen die Extinktionsänderungen $\Delta E/\text{Min.}$ mehr als 0,080, wurden 0,1 ml des Überstandes mit 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und das Ergebnis der Messung mit 0,5 ml dieser Verdünnung mit dem Faktor 10 multipliziert.

3.2.4.1. GOT-Aktivität in Tiefgefrierverdünner und Auftaulösung

Da der für die Tiefgefrierkonservierung des Spermas verwendete Verdünner aufgrund seines Eidottergehaltes eine relativ hohe GOT-Aktivität aufwies, musste bei der

Berechnung der Enzymaktivität verdünnten Spermas die Aktivität des Verdünners rechnerisch eliminiert werden. Vor jeder Tiefgefrierung wurde daher die Aktivität des entsprechenden Verdünners mit der unter 3.2.4. beschriebenen Methode bestimmt und $2/3$ der gemessenen mU/ml Verdünner von der Aktivität verdünnten Spermas abgezogen (Verdünnungsverhältnis: 1 Teil Sperma + 2 Teile Verdünner). Vergleichsmessungen zwischen ungefrorenem und gefrorenem Verdünner ergaben keine oder nur minimale Unterschiede in der Aktivität, so dass sie bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurden. Ebenso konnte der geringe Enzymgehalt der magermilchhaltigen Auftaulösung (2-4 mU/ml Lösung) bei der Berechnung der GOT-Aktivität aufgetauten Spermas vernachlässigt werden.

3.2.5. Beurteilung der Akrosomenmorphologie

Die morphologische Beurteilung der Akrosomen erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von HANCOCK (1956), PURSEL et al. (1972a), CRABO und GRAHAM (1972) und GRAHAM et al. (1971a) an unfixierten und ungefärbten Spermien.

Zur Immobilisierung der Spermien wurde die gepufferte Formolsalzlösung nach HANCOCK (1956) verwendet:

(1)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Natriumphosphat)	21,7 g
	Aqua dest. ad	500,0
(2)	KH_2PO_4 (Kaliumphosphat)	22,3 g
	Aqua dest. ad	500,0
(3)	Lösung (1)	200,0 ml
	Lösung (2)	80,0 ml
(4)	NaCl	9,01g
	Aqua dest. ad	500,0

200,0 ml der Lösung (3) wurden mit 150,0 ml der Lösung (4) und 62,5 ml kommerziellem Formalin vermischt und mit Aqua dest. auf 500,0 ml aufgefüllt. Der pH-Wert dieser Lösung beträgt $7,00 \pm 0,05$ (HANCOCK, 1956).

Etwa 0,1 ml des zu untersuchenden Spermas wurde unmittelbar nach Gewinnung der Proben je nach Spermien-dichte mit der gepufferten Formolsalzlösung im Verhältnis 1+2 bis 1+5 verdünnt. Mit einer Kapillarpipette wurde ein Tropfen dieses Gemisches (ca. 0,002 - 0,005 ml) auf einen gereinigten und entfetteten Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen (18x18mm) abgedeckt, wobei jeglicher Druck auf das Deckglas vermieden wurde. Dabei war darauf zu achten, dass der Tropfen möglichst über den grössten Teil der von dem Deckglas bedeckten Fläche verteilt war. Für jede Spermienprobe erfolgte die Beurteilung der Akrosomenmorphologie an je drei Präparaten zu jeweils 100 Spermien, insgesamt also an 300 Samenzellen/Probe.

Die Untersuchungen wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 800-facher Vergrösserung vorgenommen. Die Klassifizierung der Akrosomen erfolgte in zwei Gruppen:

I. Spermien, mit morphologisch weitgehend intakten Akrosomen:

Das Akrosom ist als sichelförmiges Gebilde mit deutlichen und scharf begrenzten apikalen Rändern sichtbar.

II. Spermien mit morphologisch geschädigten Akrosomen:

Die vorderen und hinteren Begrenzungen des Akrosoms erscheinen aufgerauht, die Sichelform geht verloren, das Akrosom ist angeschwollen.

Hier wurden auch Spermien mit in unterschiedlichem Ausmass vom Spermienkopf losgelösten Akrosomen sowie Spermien mit fehlenden Akrosomen eingereiht.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Statistische Auswertung (Überblick)

Zur statistischen Auswertung wurden die von MUDRA (1958), WEBER (1972) sowie ADAM et al. (1971) veröffentlichten Grundlagen verwendet. In der folgenden Zusammenfassung sind Parameter, statistische Methoden und Testsysteme, die bei der Berechnung der eigenen Ergebnisse verwendet wurden, dargestellt.

Parameter	Stat. Methoden	Testsystem	Transfor- mation
GOT-Aktivität abge- kühlter und aufge- tauter Spermien (Abb.2,5; Tab.1,4)	Varianz- analyse	Tukey-Test	--
Prozentsatz geschädig- ter Akrosomen abgekühl- ter und aufgetauter Spermien (Abb.3,6; Tab.2,5)	Varianz- analyse	Tukey-Test	arc.sin.
Akrosinaktivität ab- gekühlter und aufge- tauter Spermien (Abb.4,7; Tab.3,6)	Varianz- analyse	Tukey-Test	--
Prozentsatz geschäd- igter Akrosomen auf- getauter Spermien (Abb.9; Tab.7, 7a)	Varianz- analyse	Tukey-Test Scheffé-Test	arc.sin.
Akrosinaktivität aufgetauter Spermien (Abb.10; Tab.8,8a)	Varianz- analyse	Tukey-Test Scheffé-Test	--
Prozentsatz geschäd- igter Akrosomen - GOT-Aktivität (Abb.11,12; Tab.9,10)	Varianz- analyse Korrelation Regression	Tukey-Test	arc.sin.

3.3.2. Auswirkung der Abkühlung und Tiefgefrierung auf Eberspermien

Der GOT-Verlust der Samenzellen wurde über Einfachmessungen des Enzymanstiegs im extrazellulären Milieu jeder entnommenen Probe photometrisch bestimmt. In Vorversuchen wurde die Präzision der verwendeten Methode (UV-Test der Fa. BOEHRINGER) über Serienmessungen frischen, unbehandelten Spermas ermittelt ($n=10$). Bei Werten um 6,4 mU/ml Sperma betrug die Standardabweichung $\pm 0,4$ mU/ml, der Variationskoeffizient demnach $\pm 6,3$ %. Nach den Angaben von BERGMAYER (1970) erniedrigt sich dieser Wert bei Messungen von Lösungen mit höheren Aktivitäten.

Die Bestimmung der extrahierbaren Akrosinaktivität wurde für jede entnommene Probe über das kombinierte Testsystem (BAEE/ADH/NAD) an je 5 Messansätzen/Probe vorgenommen. Der Mittelwert der Akrosinaktivitäten/ 10^8 Spermien aus den 5 Parallelmessungen diente als Grundlage für die statistische Auswertung. Bei allen Versuchen betrug der Variationskoeffizient ± 7 %.

Parallel zu den Enzymaktivitätsbestimmungen (Akrosin und GOT) wurden die Auswirkungen der Abkühlung und Gefrierung auf die Akrosomenmorphologie von jeweils 300 Spermien/Probe mittels eines Phasenkontrastmikroskopes bei 800-facher Vergrößerung beurteilt. Die Prozentsätze der geschädigten Akrosomen gingen in die statistische Auswertung ein.

Eine statistische Auswertung der Bewegungsaktivitäten

aufgetauter Spermien wurde bewusst unterlassen, da nicht zu erwarten war, dass Zusammenhänge zwischen diesem Kriterium und den anderen drei Parametern bestanden. Die geschätzten Werte der Spermienmotilitäten standen daher nur als zusätzliche Kontrolldaten zur Verfügung. Die Bewegungsaktivität der nach den Methoden I bis IV aufgetauten verdünnerhaltigen Spermaproben betrug im Durchschnitt 40 - 50 % und lag somit im Rahmen der bisher mit vergleichbaren Tiefgefrieremethoden erzielten Ergebnisse. Nativ- und glyzeriniertes Sperma wiesen nach dem Auftauen keinerlei Motilität auf.

3.3.2.1. GOT- und Akrosin-Aktivität sowie Akrosomenmorphologie von Nativ- bzw. mit 2 % Glyzerin vermischten Spermien

Wie aus der Versuchsanordnung ersichtlich ist, wurde ein Teil der gewonnenen Ejakulate unbehandelt belassen (Nativsperma) und als Kontrolle zusammen mit dem mit 2 % Glyzerin versetzten (die jeweils aufgeführten Glyzerinanteile geben die Endkonzentration an) bzw. verdünnten Sperma auf +5°C innerhalb von 3 Stunden abgekühlt, tiefgefroren und nach der Methode I aufgetaut. Unmittelbar nach der Gewinnung des Spermias (+38°C), während der Abkühlung bei +15°C und +5°C sowie nach dem Auftauen erfolgte die Bestimmung der drei Parameter.

Sperma, das kurz nach der Gewinnung der Ejakulate untersucht wurde (+38°C) wies eine sehr geringe GOT-

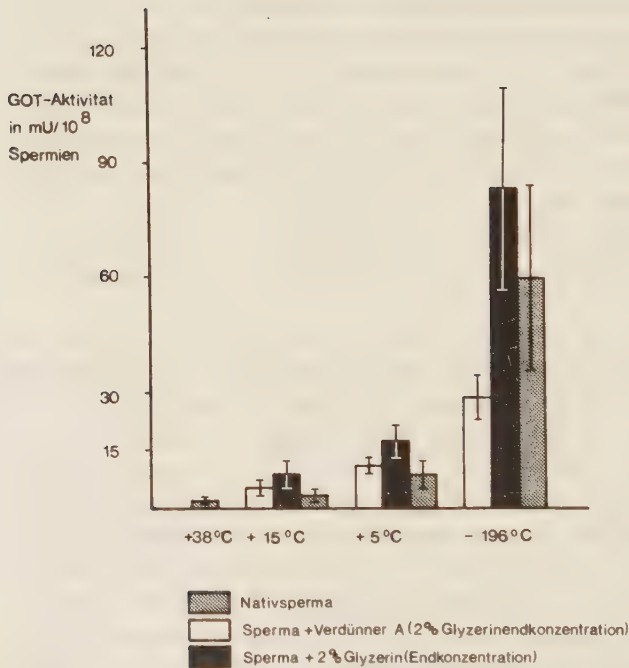


Abb. 2: Graphische Darstellung der extrazellulär gemessenen GOT-Aktivität (mU/10⁸Spermien) aus nativem, glyzerinisiertem und mit Verdünner A (2 % Glycerin) vermischtem Ebersperma bei +38°C, +15°C, +5°C sowie nach dem Auftauen mit Methode I (-196°C)

Aktivität auf $(2,1 \text{ mU}/10^8 \text{ Spermien})$. Die zur Vorbereitung für die Tiefgefrierung dienende Abkühlung auf $+5^\circ\text{C}$ bewirkte zwar eine vermehrte Enzymfreisetzung (Abb. 2), statistisch konnten aber die Aktivitätsdifferenzen zwischen den Messpunkten $+38^\circ\text{C}$, $+15^\circ\text{C}$ und $+5^\circ\text{C}$ nicht gesichert werden (Tab.1). Die Belastung durch den Tiefgefrier- und Auftauprozess dagegen führte zu erheblichen Enzymverlusten der Spermien ($57,8 \text{ mU}/10^8 \text{ Spermien}$) und somit zu einer erhöhten GOT-Aktivität im Seminalplasma, die hochsignifikant ($P \leq 0,01$) über den Werten der oben erwähnten Messpunkte lag.

Der Zusatz von 2 % Glyzerin ohne weiteres Verdünnungsmedium zum Sperma bewirkte gegenüber dem Nativsperma eine verstärkte Freisetzung der GOT aus den Samenzellen (Tab. 1; $P > 0,05$ für $+15^\circ\text{C}$ und $+5^\circ\text{C}$). Deutlicher jedoch (Abb. 2) und statistisch auch belegbar (Tab. 1) stieg die extrazellulär gemessene GOT-Aktivität der glyzerinisierten Spermien nach dem Tiefgefrieren und Auftauen ($83,4 \text{ mU}/10^8 \text{ Spermien}$) an. ($P \leq 0,01$ für alle Differenzen der 3 Proben).

Während die Abkühlung des Nativspermias bis auf $+15^\circ\text{C}$ keinen schädigenden Einfluss auf die Akrosomenmorphologie besaß, stieg bei $+5^\circ\text{C}$ der Prozentsatz geschädigter Akrosomen deutlich an ($9,2$ gegenüber $1,3$ %; $P \leq 0,01$; Tab. 2). Nach dem Auftauen waren $98,6$ % der untersuchten Akrosomen schwer geschädigt (Abb. 3). Vergleichbar mit den Ergebnissen der GOT-Messungen stieg durch den Glyzerinzusatz der Prozentsatz geschädigter Akrosomen gegenüber dem Nativsperma der Proben, die während der Abkühlung bei $+15^\circ\text{C}$ und $+5^\circ\text{C}$ entnommen wurden, hochsignifikant an ($P \leq 0,01$; Tab. 2).

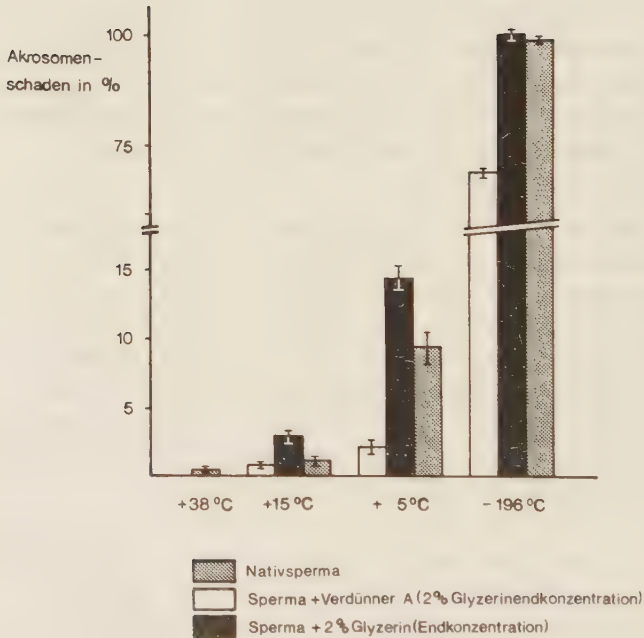


Abb. 3: Graphische Darstellung der Prozentsätze geschädigter Akrosomen aus nativem, glyzerinisiertem und mit Verdünner A (2 % Glycerin) vermischtem Ebersperma bei +38°C, +15°C, +5°C sowie nach dem Auftauen mit Methode I (-196°C)

Bei aufgetauten Proben wiesen ca. 99 % der beurteilten Spermien zerstörte Akrosomen auf.

Eine statistisch belegbare Differenz zwischen den extrahierbaren Akrosinaktivitäten des Nativspermas bei $+38^{\circ}\text{C}$, $+15^{\circ}\text{C}$ und $+5^{\circ}\text{C}$ lag nicht vor (Tab. 3). Nach der Tiefgefrierung unbehandelter Spermien stieg die extrahierbare Akrosinaktivität auf $3346,3 \text{ mU}/10^8 \text{ Spermien}$ an und lag damit über den Aktivitäten der bei $+38^{\circ}\text{C}$ und $+5^{\circ}\text{C}$ gemessenen Proben (entsprechende Werte: $2183,3 \text{ mU}/10^8 \text{ Spermien}$; $P \leq 0,05$; $2041,6 \text{ mU}/10^8 \text{ Spermien}$; $P \leq 0,01$; Tab. 3). Ein gesicherter Unterschied zwischen den extrahierbaren Aktivitäten der bei $+15^{\circ}\text{C}$ und nach dem Auftauen gemessenen Proben wurde nicht gefunden. Der Zusatz von 2 % Glycerin zum Sperma bewirkte im Vergleich zu den Werten des Nativspermas eine Erhöhung der messbaren Akrosinaktivität bei $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ sowie nach dem Auftauen (Abb. 4; $P > 0,05$; Tab. 3). Statistisch gesicherte Aktivitätsunterschiede bestanden zwischen den bei $+38^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ und nach dem Auftauen untersuchten Proben ($P \leq 0,01$; Tab. 3).

3.3.2.2. Einfluss des Tiefgefrierverdünners (2 % Glycerinendkonzentration) auf die Eberspermien während Abkühlung und Tiefgefrierung

Gemessen an der Aktivität des nur mit 2 % Glycerin versetzten Spermas, bewirkte der Zusatz eines Tief-

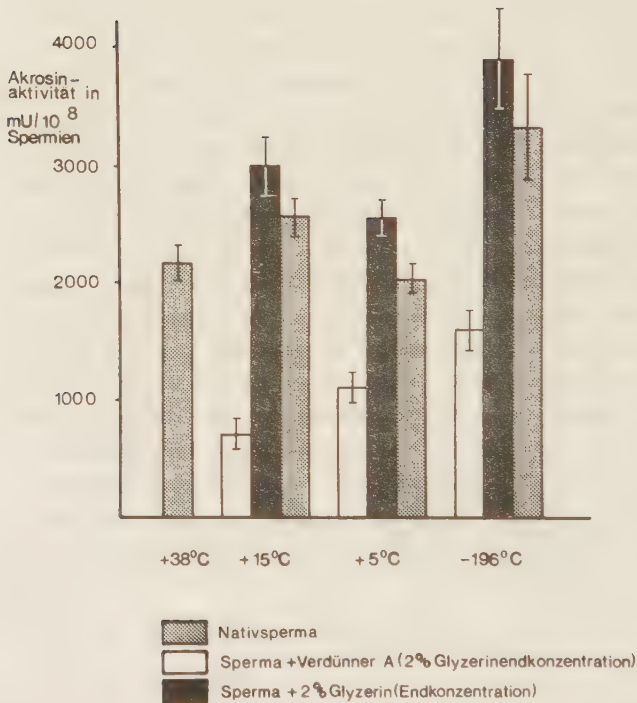


Abb. 4: Graphische Darstellung der extrahierbaren Akrosinaktivität (mU/10⁸Spermien) aus nativem, glyzerinisiertem und mit Verdüner A (2 % Glyzerin) vermishtem Ebersperma bei +38°C, +15°C, +5°C sowie nach dem Auftauen mit Methode I (-196°C)

gefrierverdünners, der ebenfalls zu einer Glyzerinendkonzentration von 2 % führte, eine Verminderung des GOT-Verlustes der Samenzellen ($P > 0,05$; Tab. 1; Abb. 2). Die Schutzwirkung des Tiefgefrierverdünners konnte aber erst bei den aufgetauten Proben statistisch belegt werden (Tab. 1).

Anhand der Beurteilung des Prozentsatzes geschädigter Akrosomen war der Einfluss der Tiefgefrierverdünners schon bei $+15^{\circ}\text{C}$ bemerkbar (Abb. 3). Durch Verdünnung des Spermas konnte der Prozentsatz morphologisch geschädigter Samenzellen bei Abkühlung auf $+15^{\circ}\text{C}$ und insbesondere auf $+5^{\circ}\text{C}$ deutlich niedriger ($P \leq 0,01$; Tab. 2) gehalten werden, als bei Nativ- bzw. glyzerinhaltigen Spermaproben. Analog zu den Ergebnissen der GOT-Aktivitätsbestimmungen lag der Prozentsatz zerstörter Akrosomen nach der Tiefgefrierung signifikant unter den Werten, die für die Kontrollgruppe und das glyzerinisierte Sperma errechnet wurden ($P \leq 0,01$; Tab. 2).

Der Zusatz des Verdünners bewirkte eine extreme Reduzierung der extrahierbaren Akrosinaktivität in allen untersuchten Phasen des Untersuchungsganges ($P \leq 0,01$; Tab. 3, Abb. 4). Der schädigende Einfluss der dreistündigen Abkühlung und des Tiefgefrierens resultierte jedoch in einem Anstieg der Akrosinaktivität bei $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ und nach dem Auftauen ($P > 0,05$). Die Werte der aufgetauten verdünnerhaltigen Proben lagen dabei aber noch unter denen der Kontrolle ($P > 0,05$; Tab. 3).

3.3.2.3. Auswirkungen steigender Glyzerinkonzentrationen in Tiefgefrierverdünnern auf Eberspermien

Anhand der oben beschriebenen Ergebnisse ist ersichtlich, dass schon durch die vor der Tiefgefrierung stattfindende Abkühlung eine Beeinflussung sowohl der Akrosomenmorphologie als auch des Enzymstatus unbehandelter, glyzerinierter und verdünnter Spermien stattfindet. Nach der Tiefgefrierung bzw. dem Auftauen (Methode I) treten diese Veränderungen in verstärktem Masse auf. Die Vermischung der Ejakulate mit einem Tiefgefrierverdünner (Verdünner A) bewirkte aber verglichen mit den Werten des Kontroll- bzw. glyzerinisierten Spermas eine drastische Reduzierung der durch das Einfrieren verursachten Veränderungen.

In einem weiteren Versuch wurde der Zusatz steigender Glyzerinkonzentrationen in Verdünnern auf Eberspermien während der Abkühlung und Tiefgefrierung überprüft. Die sofort nach Gewinnung der Ejakulate bestimmten Enzymaktivitäten und Akrosomenschäden von Nativ- sowie mit dem Verdünner A (2 % Glyzerin) vermischten Sperma ($+38^{\circ}\text{C}$) dienten als Kontroll- bzw. Ausgangswerte. Die in diesem Versuch zusätzlich benötigten Verdüner B und C unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung von Verdünner A lediglich durch den höheren Glyzerinanteil von 6 bzw. 9 % (4 bzw. 6 % in Endkonzentration).

Wie aus der Abb. 5 ersichtlich ist, bewirkte die Verdünnung (Verdünner A) frisch ejakulierter Sper-

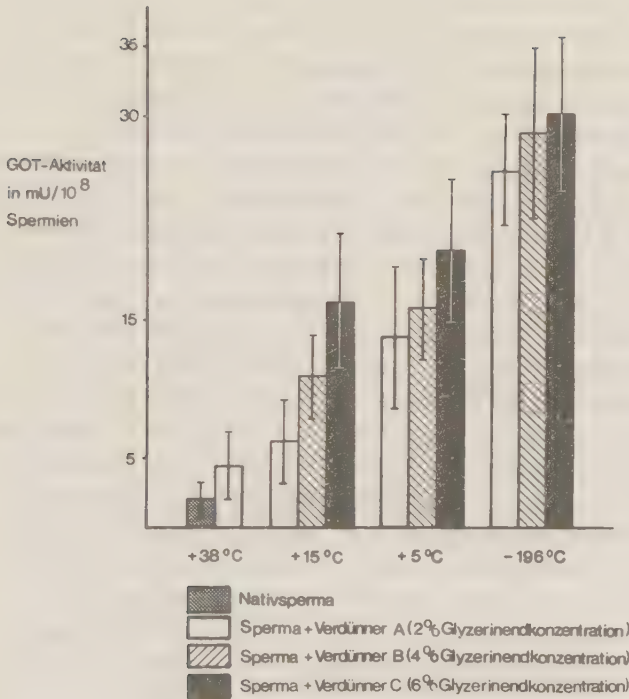


Abb. 5: Graphische Darstellung der extrazellulären GOT-Aktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus nativem (+38°C), bei +38°C (Verdünner A, 2 % Glyzerinendkonzentration) und +22°C verdünntem (Verdünner A,B,C - 2, 4, 6 % Glyzerinendkonzentration) Ebersperma während der Abkühlung bei +15°C, +5°C sowie nach dem Auftauen mit Methode II.

mien bei $+38^{\circ}\text{C}$ eine vermehrte Freisetzung der GOT aus den Zellen ($5,6 \text{ mU}/10^8$ Spermien gegenüber $2,2 \text{ mU}/10^8$ Spermien der Kontrolle; $P > 0,05$; Tab. 4). Die Zugabe des Verdünners A nach einer einstündigen Aufbewahrung des Nativspermias bei Zimmertemperatur und anschliessender Abkühlung auf $+5^{\circ}\text{C}$ hatte bei den Spermaproben, die bei Erreichen von $+15^{\circ}\text{C}$ entnommen wurden, keinen zusätzlichen Enzymverlust zur Folge. Die höheren Glyzerinanteile der Verdüner B und C verursachten eine gewisse Erhöhung der im extrazellulären Medium vorhandenen GOT-Aktivitäten ($P > 0,05$; Abb. 5; Tab. 4). Entsprechend den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe bedingte die weitere Abkühlung der Spermien einen Anstieg der bei $+5^{\circ}\text{C}$ gegenüber $+15^{\circ}\text{C}$ messbaren GOT-Aktivität ($P > 0,05$). Wie bei $+15^{\circ}\text{C}$ war auch hier mit steigender Glyzerinkonzentration der Verdüner ein grösserer Enzymverlust der Samenzellen verbunden ($P > 0,05$). Zwischen den beiden Messgruppen $+15^{\circ}\text{C}$ und $+5^{\circ}\text{C}$ bestanden keinerlei signifikante Aktivitätsunterschiede. Die GOT-Aktivität aufgetauter Spermien (Methode II) lag deutlich über allen Werten der vor der Tiefgefrierung untersuchten Proben ($P \leq 0,01$; Tab. 4).

Mit steigender Glyzerinkonzentration war der Prozentsatz geschädigter Akrosomen in allen untersuchten Abschnitten der Versuchsreihe erhöht (Abb. 6; $P \leq 0,01$; Tab. 5). Die Schädigung der Spermien durch die Abkühlung von $+15^{\circ}\text{C}$ auf $+5^{\circ}\text{C}$ war bei den beiden höheren Glyzerinkonzentrationen statistisch belegbar ($P \leq 0,05$ bzw. $P \leq 0,01$; Tab. 5). Eine Glyzerinendkonzentration von 6 % führte sowohl bei $+15^{\circ}\text{C}$ als auch

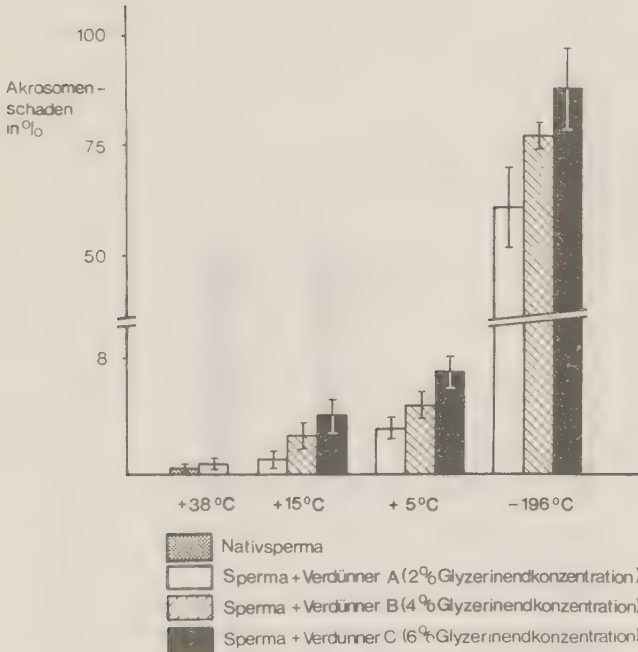


Abb. 6: Graphische Darstellung des Prozentsatzes geschädigter Akrosomen aus nativem (+38°C), bei +38°C (Verdünner A, 2 % Glyzerinendkonzentration) und +22°C verdünntem (Verdünner A,B,C - 2, 4, 6 % Glyzerinendkonzentration) Ebersperma während der Abkühlung bei +15°C, +5°C sowie nach dem Auftauen mit Methode II.

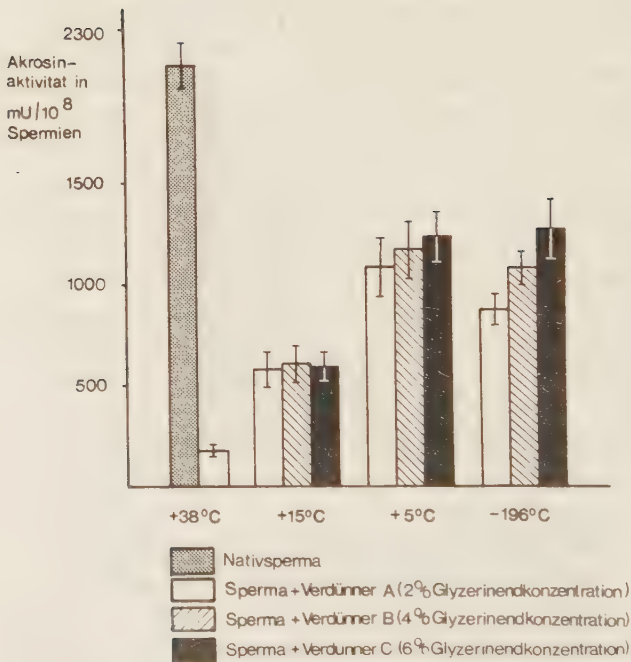


Abb. 7: Graphische Darstellung der extrahierbaren Akrosin-aktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus nativem ($+38^\circ\text{C}$), bei $+38^\circ\text{C}$ (Verdünnung A, 2 % Glyzerinendkonzentration) und $+22^\circ\text{C}$ verdünntem (Verdünnung A, B, C - 2, 4, 6 % Glyzerinendkonzentration) Ebersperma während der Abkühlung bei $+15^\circ\text{C}$, $+5^\circ\text{C}$ sowie nach dem Auftauen mit Methode II

bei $+5^{\circ}\text{C}$ zu einem erheblich höheren Anteil geschädigter Akrosomen als die niedrigste Konzentration von 2 %.

Der Tiefgefrier- und Auftauprozess (Methode II) verursachte einen extremen Anstieg des Anteils geschädigter Akrosomen ($P \leq 0,01$; Abb. 6; Tab. 5).

Die Verdünnung der Spermien bei $+38^{\circ}\text{C}$ bewirkte im Vergleich zu den Werten des bei $+38^{\circ}\text{C}$ gemessenen Nativspermas eine extreme Reduzierung der extrahierbaren Akrosinaktivität ($P \leq 0,01$; Tab. 6; Abb. 7). Die Abkühlung der Proben führte bei $+15^{\circ}\text{C}$ ($P > 0,05$) und verstärkt bei $+5^{\circ}\text{C}$ ($P \leq 0,01$) zu einer Erhöhung der Aktivität (Abb. 7).

Überraschenderweise konnte nach dem Auftauen (Methode II) im Vergleich zu den bei $+5^{\circ}\text{C}$ untersuchten Proben keine wesentliche Veränderung der Akrosinaktivität festgestellt werden ($P > 0,05$; Tab. 6).

Die unterschiedlichen Glyzerinkonzentrationen besaßen in allen Phasen der Tiefgefrierkonservierung keinen Einfluss auf die extrahierbare Akrosinaktivität (Abb. 7; Tab. 6).

3.3.2.4. Einfluss verschiedener Auftaumethoden auf die GOT- und Akrosinaktivität sowie die Akrosomenmorphologie tiefgefrierkonservierter Eberspermien

In den Abbildungen 8 bis 10 sind die Enzymaktivität-

ten und die Prozentsätze geschädigter Akrosomen der tiefgefrorenen Spermaproben, die mit den in beiden Versuchsreihen verwendeten Methoden aufgetaut wurden, zusammenfassend dargestellt. Anhand der unterschiedlichen Methoden sollte vor allem überprüft werden, ob differierende Auftauraten den Auftauprozess in irgendeiner Weise zu beeinflussen vermochten.

Grundsätzlich können die 4 Auftaumethoden in zwei Gruppen zusammengefasst werden:

Methode I und III: Der Auftauvorgang erstreckt sich hier über mehrere Minuten. Die Pellets werden einzeln (Methode I) bzw. gemeinsam zu vorgewärmter bzw. tiefgefrorener (Methode III) Auftaulösung zugefügt und aufgetaut.

Methode II und IV: In 35 bis 40 Sekunden (Methode II) bzw. 11 bis 12 Sekunden (Methode IV) wird eine vollständige Verflüssigung der Spermapellets erzielt, wobei die jeweils benötigte Menge an Pellets gleichzeitig zu vorgewärmter ($+40^{\circ}\text{C}$ bzw. $+60^{\circ}\text{C}$) Auftaulösung zugefügt wurden.

Da der für die gesamten Aktivitäten der nach den Methoden I (erste Versuchsreihe), II, III und IV (2. Versuchsreihe) aufgetauten Spermaproben (Abb. 8) ermittel-

te F-Wert (Varianz-Analyse) nicht signifikant war ($P > 0,05$), erfolgte keine weitere statistische Abtestung der GOT-Aktivitätsdifferenzen innerhalb bzw. zwischen diesen Gruppen.

Abb. 9 und Tab. 7 zeigen den Vergleich der Prozentsätze geschädigter Akrosomen des mit den Methoden I, II, III und IV aufgetauten Spermas. Ausser den Differenzen zwischen den Gruppen I A - IV B, II C - III B sowie II C - IV C und III A - IV C (Tab. 7) waren die Unterschiede der durch die Auftaumethoden und verschiedenen Glyzerinanteile bewirkten Akrosomenschäden statistisch gesichert (Tab. 7).

In der gruppenweisen Abtestung der Differenzen (Tab. 7a) unterschieden sich die Werte für die Auftaugruppen II A, B, C und IV A, B, C hochsignifikant von denen der Gruppen I und III A, B, C. Der Prozentsatz geschädigter Akrosomen lag für die nach den Methoden I und III aufgetauten Spermien wesentlich über den Werten der nach den Methoden II und IV aufgetauten Proben ($P \leq 0,01$; Tab. 7a). Darüber hinaus unterschieden sich die Auftaugruppen IV deutlich von den drei anderen Methoden. Die mit dieser Methode aufgetauten Spermaproben besaßen im Durchschnitt die niedrigsten Anteile morphologisch geschädigter Akrosomen ($P \leq 0,01$; Tab. 7a).

Mit Ausnahme signifikanter Aktivitätsdifferenzen zwischen den Werten der nach den Methoden I und IV aufgetauten Proben konnte kein statistisch gesicher-

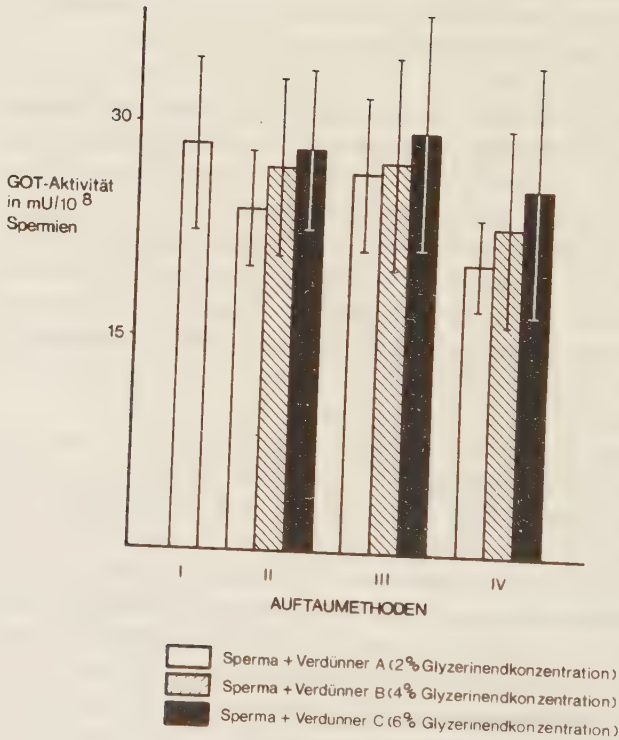


Abb. 8: Graphische Darstellung der extrazellulär gemessenen GOT-Aktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus verdünntem (Verdünner A, B, C - 2, 4, 6 % Glyzerinendkonzentration) und mit den Methoden I - IV aufgetautem Ebersperma

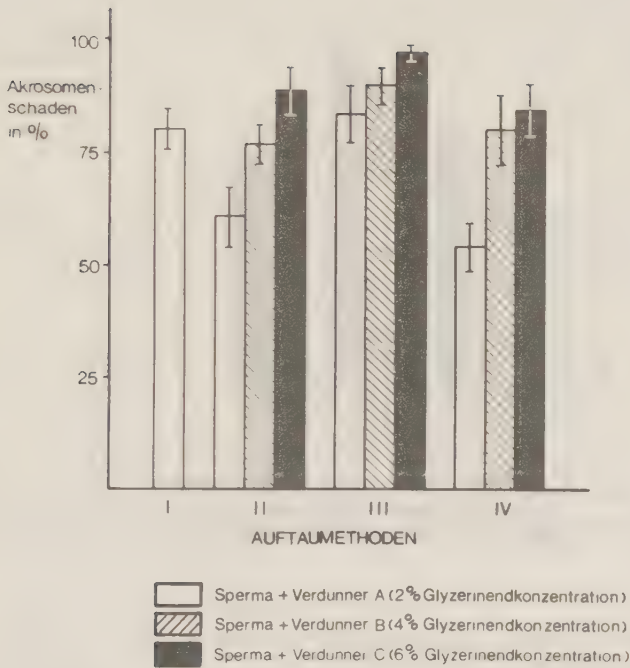


Abb. 9: Graphische Darstellung des Prozentsatzes geschädigter Akrosomen aus verdünntem (Verdünner A, B, C - 2, 4, 6 % Glycerinendkonzentration) und mit den Methoden I - IV aufgetautem Ebersperma

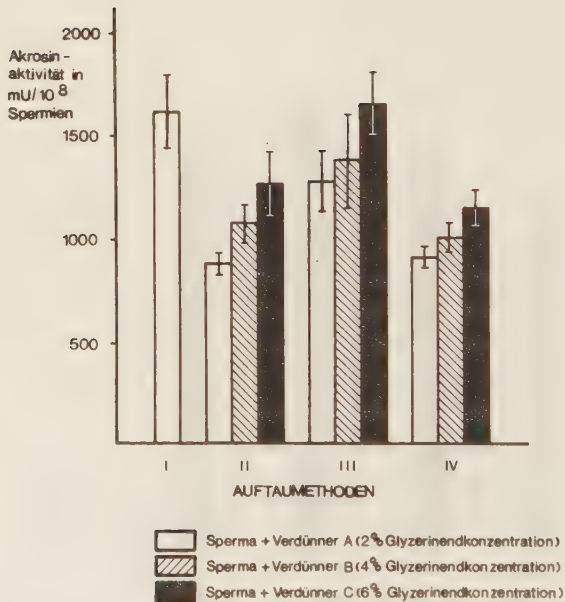


Abb.10: Graphische Darstellung der extrahierbaren Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus verdünntem (Verdünner A, B, C - 2, 4, 6 % Glycerinendkonzentration) und mit den Methoden I - IV aufgetautem Ebersperma

ter Einfluss der verschiedenen Auftaumethoden auf die extrahierbare Akrosinaktivität festgestellt werden (Abb. 10; Tab. 8). In der gruppenweisen Abtestung der Akrosinaktivitätsunterschiede lagen die Werte der nach den Methoden II und IV aufgetauten Proben signifikant unter denen der Gruppen I und III (Abb. 10; Tab. 8a).

3.3.2.5. Korrelationen zwischen der Akrosin- und GOT-Aktivität sowie der Akrosomenmorphologie von Eberspermien

Die in beiden Versuchsreihen für unbehandeltes, glyzerinisiertes und verdünntes Sperma (Verdünner A, B und C) bei $+38^{\circ}\text{C}$, $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ sowie nach dem Auftauen (Methode I bis IV) erhaltenen Enzymaktivitäten (Akrosin- und GOT-Aktivität) und Prozentsätze geschädigter Akrosomen wurden in direkte Beziehung zueinander gebracht.

In beiden Versuchsabschnitten ergaben sich hochsignifikante, positive Korrelationen bzw. Regressionen zwischen der photometrisch ermittelten GOT-Aktivität und den lichtmikroskopisch wahrnehmbaren Akrosomenschäden (Abb. 11 und 12; Tab. 9 und 10). Der lineare bzw. quadratische Teil der Funktion x zu y konnte in beiden Fällen statistisch gesichert werden ($P \leq 0,01$).

Für die Akrosin- und GOT-Aktivität im ersten Versuchsabschnitt konnte zudem eine positive Korrelation ($P \leq 0,05$) berechnet werden.

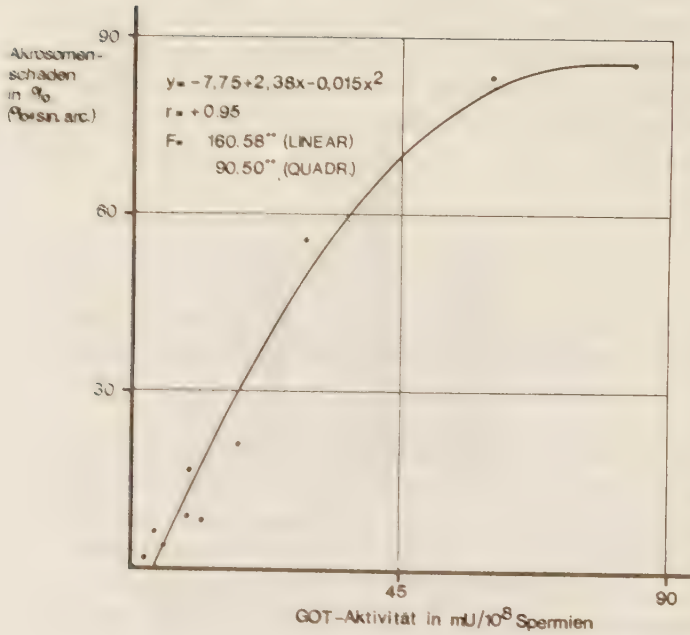


Abb. 11: Graphische Darstellung der Regression von x (GOT-Aktivität in mU/10⁸ Spermien) zu y (Akrosomenschäden in % - % $\hat{=}$ sinus arcus)
 $r = +0.95$

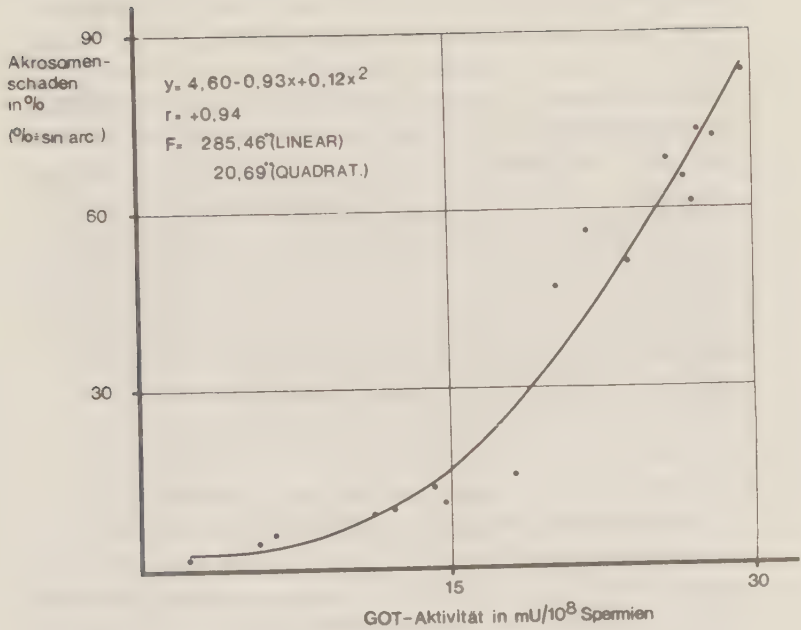


Abb. 12: Graphische Darstellung der Regression von
x (GOT-Aktivität in mU/10⁸ Spermien) zu y
(Akrosomenschaden in % - % $\hat{=}$ sinus arcus)
 $r = +0,94$

4. DISKUSSION

Während sich die Tiefgefrierung von Bullenspermien in den vergangenen Jahren inzwischen zum Routineverfahren in der künstlichen Besamung entwickelt hat, gelang es bisher nicht, das Befruchtungsvermögen von Eberspermien durch Tiefgefrierung so zu konservieren, dass wirtschaftlich vertretbare Konzeptionsraten erreicht wurden. Die bei tiefgefrorenen Bullenspermien zur Beurteilung des Befruchtungsvermögens allgemein verwendete Schätzung der Bewegungsaktivität aufgetauten Samens erwies sich für gefrierkonservierte Eberspermien als unbrauchbar (WILMUT und POLGE, 1971, 1972). Mit Eberspermien, die nach dem Auftauen eine "relativ gute" Motilität aufwiesen (ROHLOFF, 1967b; ROHLOFF und ALLMELING, 1970, 1971; GROVE et al., 1968) konnte nicht der erwartete Befruchtungserfolg erzielt werden (HILLMANN, 1972; PURSEL et al., 1969b; SETTERGREN, 1958; POLGE, 1959).

Man ging deshalb dazu über, andere Beurteilungskriterien, wie die Bestimmung der extrazellulären GOT-Aktivität und die Beurteilung der Akrosomenmorphologie in die Untersuchungen über die Tiefgefrierkonservierung von Eberspermien einzubeziehen (CRABO et al., 1970; GRAHAM et al., 1971a; PURSEL et al., 1972a; RÄTZ und MATTHEUS, 1972; GRAHAM und CRABO, 1972; HILLMANN und TREU, 1973; BOWER et al., 1973; PURSEL und JOHNSON, 1974a,b).

Obwohl mit Hilfe dieser Parameter deutliche Verbesserun-

gen in Bezug auf Verdünnungs-, Gefrier- und Auftau-techniken erzielt wurden (GRAHAM et al., 1971a,b; CRABO et al., 1972b; ROMENY et al., 1974a,b,c), insbesondere durch verbesserte Schutzwirkung vor Abkühlungs- und Gefrierschäden, konnten wirtschaftlich tragbare Befruchtungserfolge an grossem Zahlenmaterial nicht reproduziert werden.

Nach allgemeiner Ansicht manifestiert sich der Hauptschaden durch den Tiefgefrierprozess am Akrosom. Der Zustand des Akrosoms konnte aber mit den bisher bekannten Methoden nur unzureichend erfasst werden. Die Untersuchungen der Akrosomenmorphologie erlauben lediglich Rückschlüsse auf den Zustand der Plasmam- und äusseren Akrosomenmembran, ohne den Enzymstatus dieses Systems zu erfassen.

Mit dem Nachweis, der Isolierung und Charakterisierung der akrosomalen Protease Akrosin (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1969, 1972a; ZANEVELD et al., 1972a; POLAKOSKI et al., 1972a,b; FINK et al., 1972; SCHIESSLER et al., 1972; SCHLEUNING und FRITZ, 1974) wurde erstmals die Möglichkeit gegeben, einen spezifischen Bestandteil des Akrosoms zu erfassen und in die Überprüfung der Tiefgefrierverfahren von Eberspermen einzubeziehen.

Neben der Bestimmung der extrazellulären GOT-Aktivität und dem lichtoptisch erfassbaren morphologischen Zustand des Akrosoms wurde in der vorliegenden Arbeit die Messung der extrahierbaren Akrosinaktivität als zusätzlicher Parameter in die Untersuchungen mit einbezogen.

Im Verlauf des Abkühlungs- und Tiefgefrierprozesses wurde der Einfluss verschiedener Glycerinkonzentrationen, die Auswirkung eines Tiefgefrierverdünners und der Effekt verschiedener Auftaumethoden untersucht.

Unverdünntes Sperma zeigte bereits ab $+15^{\circ}\text{C}$ einen Anstieg der extrazellulär gemessenen GOT-Aktivität und des Prozentsatzes morphologisch geschädigter Akrosomen, der nach dem Auftauen maximale Werte erreichte (Abb. 2 und 3). Vergleichbare Ergebnisse bei GOT-Messungen erhielten PURSEL et al. (1970) und HILLMANN und TREU (1973) von unbehandelten, kältegeschockten bzw. tiefgefrorenen Eberspermien. Der Abkühlungsprozess scheint sich jedoch weniger stark auf die extrahierbare Akrosinaktivität von unverdünnten Spermien auszuwirken (Abb. 4), während nach dem Tiefgefrieren auch bei Akrosin ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivität beobachtet wurde. Interessanterweise lagen die entsprechenden Durchschnittswerte bei alleinigem Zusatz von Glycerin (2 % Glycerin in Endkonzentration) ausnahmslos über den Werten, die für unbehandeltes Sperma gefunden wurden (Abb. 2, 3 und 4). Einen ähnlichen Anstieg der Akrosinaktivität fand SCHILL (1973a, 1974a) bei glyzerinbehandeltem Humansperma vor und nach Tiefgefrierung.

Da die extrazellulär nachweisbare GOT- sowie die extrahierbare Akrosinaktivität in hohem Masse vom Membranzustand der gesamten Zelle bzw. des Akrosoms abhängig sind (LADUE et al., 1954; KATTUS, 1956; PEDERSEN, 1972; WENDT, 1974; SCHILL, 1973a, 1974a),

dürften die erhöhten Werte bei glyzerinbehandelten Samenzellen auf einen schädigenden Einfluss des Glycerins zurückzuführen sein. Für die erhöhten Akrosinaktivitäten durch Glycerinzusatz wird von SCHILL (1973a) auch die Aktivierung eines Zymogens in Betracht gezogen. Durch alleinigen Glycerinzusatz werden die bei der Tiefgefrierung auftretenden osmotischen Veränderungen bzw. intrazellulären Elektrolytverschiebungen wahrscheinlich potenziert (PURSEL et al., 1969a; HOOD et al., 1970).

Der gleichzeitige Zusatz eines eidotterhaltigen Sperma verdünners konnte den schädigenden Effekt des Glycerins erheblich vermindern.

Vergleichbar mit den Ergebnissen von HILLMANN und TREU (1973) stieg die extrazelluläre GOT-Aktivität und der Prozentsatz geschädigter Akrosomen während der Abkühlung auf $+5^{\circ}\text{C}$ und in wesentlich stärkerem Masse nach der Tiefgefrierung des verdünnten Spermas an (Abb. 2, 3, 5 und 6). Die bei den entsprechenden Temperaturstufen gemessene Akrosinaktivität war gegenüber den Werten der bei $+38^{\circ}\text{C}$ verdünnten Proben ebenfalls erhöht, erreichte aber selbst nach der Tiefgefrierung nicht die Ausgangsaktivitäten des Nativspermas (Abb. 7).

Einen ähnlichen Effekt konnte SCHILL (1973b) bei Humansperma, CHURCH und GRAVES (1973) bei Bullen- und JOHNSON et al. (1974) bei Eberejakulaten, die mit eidotterhaltigen Tiefgefrier verdünnern vermischt worden waren, bemerken.

Wahrscheinlich bewirken die im Verdünner enthaltenen Membranprotektiva eine "erschwerete Akrosinextraktion"

im Vergleich zu unverdünntem, gewaschenem Nativsperma, die schliesslich zu einer niedrigeren Akrosinaktivität im Akrosomenextrakt führen. Es erscheint möglich - darauf weisen auch die den Akrosomenmembranen anhaftenden Eidotterpartikel bei lichtmikroskopischen Untersuchungen hin -, dass die Membranprotektiva, insbesondere die im Verdünner enthaltenen Substanzen des Eidotters, durch biochemische bzw. elektrostatische Bindung an die Akrosomenmembranen als zusätzlicher "mechanischer" Schutzwall gegen chemische (saure Extraktion) und temperaturabhängige Schädigung (Abkühlung und Tiefgefrierung) fungieren. Durch Verdünnung des Spermas unter Zusatz von Eidotter und kombiniertem Puffersystem (TES und Tris) können die bei unverdünnten Spermien nach Abkühlung bzw. Tiefgefrierung aufgetretenen Schäden weitgehend reduziert werden.

Eine Erhöhung der extrazellulären GOT- und extrahierbaren Akrosinaktivität sowie des Prozentsatzes geschädigter Akrosomenmembranen konnte, in Abhängigkeit zur Glycerinkonzentration, beobachtet werden. Bereits bei Abkühlung des verdünnten Spermas auf $+15^{\circ}\text{C}$ führte ein Glycerinzusatz von 6 % im Vergleich zum Nativsperma zu einer allgemeinen Membranschädigung und somit zu einer höheren Transaminasefreisetzung, in die auch der besonders empfindlich auf Noxen reagierende Akrosomenabschnitt der Spermien mit einbezogen wird (KUNZE et al., 1972; JONES, 1972, 1973a,b). Die Zusammenhänge zwischen Glycerinkonzentration und Schädigung der Spermien, wie sie durch den GOT-Verlust

nachweisbar sind - ähnliche Ergebnisse erhielten CRABO et al. (1970) und BOWER et al. (1973) - werden zudem durch die Resultate der morphologischen Akrosomenbeurteilung verdeutlicht (Abb. 6): Die Toxizität höherer Glyzerinkonzentrationen wirkt sich augenscheinlich besonders auf die Plasma- und äussere Akrosomenmembran aus. Die durch 6 % Glyzerinzusatz bedingten Membranalterationen sind mit lichtmikroskopischer Beurteilung der Akrosomenmorphologie im Verlaufe des Abkühlungsprozesses bereits bei +15°C erkennbar (Abb. 6). Ebenso zeichnen sich bei dieser Temperaturstufe, unabhängig vom Glyzerinanteil, deutliche Steigerungen der Akrosinaktivität ab (Abb. 7). Die schädigende Wirkung dieser Glyzerinkonzentrationen ohne eine zusätzliche Belastung durch das Tiefgefrieren konnte auch von POLGE (1956) und von LEIDL (1968) beobachtet werden.

Die Parameter Akrosin und Akrosomenmorphologie erwiesen sich bei der Beurteilung der Spermischädigungen deutlich empfindlicher als die GOT-Aktivität. Diese gibt lediglich Hinweise auf den Gesamtstatus der Spermienmembran, ohne das offensichtlich für das Befruchtungsvermögen der Spermien besonders wichtige Akrosom spezifisch mit einzubeziehen.

In dieser Hinsicht konnte die Bestimmung der extrahierbaren Akrosinaktivität und die Untersuchung der Akrosomenstruktur in bezug auf Erfassung hochgradiger Akrosomenalterationen als gleichwertig bezeichnet werden, während bei leichten Schäden die subjektive Beurteilung der Morphologie gewisse Schwierigkeiten bereitet.

Auch in der zweiten Versuchsreihe unterschieden sich die Akrosinaktivitäten verdünnerhaltiger Spermaproben nach dem Auftauen nur unwesentlich von Spermien, die auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt wurden. Die morphologisch erfassbaren Membranschäden des Akrosoms waren jedoch bei beiden Temperaturstufen ($+5^{\circ}\text{C}$ und -196°C) unterschiedlich (Abb. 6). Während beim Abkühlungsprozess auf $+5^{\circ}\text{C}$ etwa 8 % der Akrosomen sichtbar geschädigt wurden, erhöhte sich dieser Prozentsatz nach dem Auftauen je nach Glyzerinkonzentration auf 53 - 97 % (Abb. 6). In der Versuchsreihe mit nativem und glyzerinisiertem Sperma ging der hohe Anteil von Akrosomenschäden auch mit einem deutlichen Anstieg der extrahierbaren Akrosinaktivität einher. Bei verdünntem Sperma wurden jedoch die Aktivitäten des Nativspermas nicht erreicht, auch wenn gegenüber den unmittelbar nach der Gewinnung verdünnten Samenzellen ein Aktivitätsanstieg gefunden wurde (Abb. 7). Diese Aktivitätserhöhung lag bereits bei $+5^{\circ}\text{C}$ (2 % Glyzerin) bei allen Proben über dem Ausgangswert, während sich bei Untersuchungen der Akrosomenmorphologie nur Proben mit 4 bzw. 6 % Glyzerinzusatz von frischem, verdünntem Sperma unterschieden.

Daher erlaubte die Akrosinaktivitätsbestimmung bei Temperaturen zwischen $+38^{\circ}\text{C}$ und $+5^{\circ}\text{C}$ genauere Aussagen als die morphologische Beurteilung des Akrosoms.

Nach dem Auftauen bestand zwischen Akrosomenmorphologie und Akrosinaktivität in bezug auf die absoluten Werte keine Relation mehr. Offensichtlich wirken sich Noxen, die durch den Tiefgefrier- bzw. Auftauprozess hervorgerufen werden, auf Morphologie

und extrahierbare Enzymaktivität unterschiedlich stark aus. Die Tendenz der nachweisbaren Schäden ist jedoch bei beiden Parametern gleich.

Aus der gleichbleibenden extrahierbaren Akrosinaktivität aufgetauter Spermien gegenüber der auf $+5^{\circ}\text{C}$ abgekühlten Proben ist jedoch zu entnehmen, dass die Tiefgefrierung bzw. das Auftauen keine grösseren Noxen setzt, als die bereits durch die Abkühlung verursachten. Zieht man die extrahierbare Akrosinaktivität als Parameter für den Zustand der inneren Akrosomenmembran heran (als Sitz des Akrosins), setzt die Abkühlung der Spermien ähnliche bzw. entsprechende Schäden wie die eigentliche Tiefgefrierung.

Voraussetzung für die Stabilität der inneren Akrosomenmembran scheint allerdings ein Schutz durch Verdünnersubstanzen, was durch die überdurchschnittliche Zunahme der Akrosinaktivität unverdünnter Spermien nach dem Tiefgefrieren verdeutlicht wird. Diese Ansicht wird durch die Beobachtungen von SCHILL (1973b), der bei Tiefgefrierung von Humanspermien mit Eidotterzusätzen ebenfalls eine Abnahme der Aktivität feststellte, bestätigt. Die relative Stabilität der inneren Akrosomenmembran wird nach dem Tiefgefrieren anscheinend durch die Art des Auftauens beeinflusst (Abb. 10). Es zeigte sich, dass bei einer langsamen Verflüssigung der Pellets, d.h. innerhalb einiger Minuten, die Akrosomenaktivität wesentlich höher lag, als bei raschem Auftauen innerhalb von 40 Sekunden (Abb. 10; Tab. 8, 8a). Dies deutet darauf hin, dass bei einem raschen Wechsel

des Aggregatzustandes der Grad der Schädigung geringer gehalten werden kann, als bei einem protrahierten Verfahren. Bestätigt wird diese Beobachtung durch die Befunde der morphologischen Untersuchung (Abb. 9; Tab. 7, 7a). Unter Berücksichtigung beider Parameter erwies sich die schnellste Auftaumethode als das schonendste Verfahren.

Die Bestimmung der extrazellulären GOT-Aktivität gab keine Hinweise auf einen unterschiedlichen Einfluss der Auftaumethoden.

Unabhängig vom Auftauverfahren war der schädigende Einfluss höherer Glyzerinkonzentrationen so stark, dass er selbst nach dem Auftauen trotz der massiven zusätzlichen Alterationen durch den Tiefgefrierprozess bei allen drei Kriterien in Erscheinung trat. Signifikante Unterschiede konnten jedoch nur über die Beurteilung der Akrosomenmorphologie gefunden werden.

Offensichtlich werden die beim Abkühlen der Spermien durch hohe Glyzerinkonzentrationen entstehenden Schäden potenziert, so dass sich das Tiefgefrieren nur noch unwesentlich auf diese "programmierten" Läsionen der Akrosomen auswirkt. Daraus erklärt sich die Korrelation von $r = +0,67$ ($P \leq 0,05$; Abb. 11, 12; Tab. 9, 10) zwischen dem für das Akrosom spezifischen Akrosin und der GOT, einem bilokulären Enzym. Bei Verwendung von Membran-

protektiva liessen sich diese Beziehungen nicht mehr nachweisen ($r = +0,29$; $P > 0,05$; Tab. 10).

Vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Autoren (CRABO und GRAHAM, 1972; HILLMANN und TREU, 1973) konnten in beiden Versuchsreihen statistisch gesicherte Korrelationen zwischen der extrazellulär gemessenen GOT-Aktivität und dem Prozentsatz morphologisch geschädigter Akrosomen gefunden werden ($r = +0,95$ bzw. $+ 0,94$; $P \leq 0,01$; Tab. 9, 10; Abb. 10, 12). Beide Parameter geben somit analoge Informationen über den Zustand der Zellmembranen.

Die Bestimmung von Akrosin, einem Enzym, das wahrscheinlich auf der inneren Akrosomenmembran lokalisiert ist und dessen extrahierbare Aktivität vom Membranzustand des Akrosoms direkt abhängig ist (PEDERSEN, 1972; SCHILL, 1974a; WENDT, 1974), erlaubte jedoch objektive Aussagen über einen Bereich der Spermien, der besonders empfindlich auf Änderungen des physiologischen Milieus reagiert und als Träger von Eihüllen penetrierenden Enzymen bei der Befruchtung eine entscheidende Rolle spielt (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1968, 1969, 1972a).

Als spezifischer Parameter des akrosomalen Status kann die Bestimmung der Akrosinaktivität mehr Informationen über Zeitpunkt und Grad der Spermenschädigungen im Verlaufe der Tiefgefrier-

konservierung, speziell des Abkühlungsprozesses liefern, als die Messung der extrazellulären GOT-Aktivität und die Beurteilung der Akrosomenmorphologie.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde überprüft, ob die enzymatische Bestimmung der akrosomalen Protease Akrosin als spezifischer Bestandteil des Akrosoms im Vergleich zur Messung der GOT-Aktivität und der morphologischen Beurteilung des Akrosoms zusätzliche Informationen über die Auswirkungen der Tiefgefrierkonservierung auf Eberspermien geben kann.

Die Akrosinaktivität wurde über saure Extraktion des Akrosins und das kombinierte BAEE/ADH Testsystem quantitativ erfasst. Die Bestimmung des extrazellulären GOT-Gehaltes erfolgte mit dem UV-Mono-Testsystem der Fa. BOEHRINGER. Der Prozentsatz geschädigter Akrosomen wurde an unfixierten und ungefärbten, mit einer gepufferten Formolsalzlösung immobilisierten Spermien ermittelt.

Die Überprüfung der drei Parameter erfolgte an Nativsperma, an unverdünnten Samenproben mit 2 % Glycerinzusatz sowie an verdünnten Samenproben, die 2, 4 und 6 % Glycerin in Endkonzentration enthielten.

Im split-sample-Verfahren wurden in zwei Versuchsreihen je 3 Ejakulate von 3 Ebern untersucht.

Die Abkühlung verdünnter Spermien auf $+15^{\circ}\text{C}$ resultierte in einer Erhöhung der extrazellulären Akrosinaktivität ($P \leq 0,01$) sowie einem Anstieg morphologisch geschädigter Akrosomen ($P \leq 0,01$). Dagegen wurde nur eine geringe Zunahme der extrazellulären GOT-Akti-

vität beobachtet ($P > 0,05$).

Der Tiefgefrierprozess verursachte eine Erhöhung der extrazellulären GOT-Aktivität ($P \leq 0,01$) und des Prozentsatzes geschädigter Akrosomen ($P \leq 0,01$). Die extrahierbare Akrosinaktivität blieb jedoch im Vergleich zu den Werten bei $+5^{\circ}\text{C}$ weitgehend unverändert ($P > 0,05$).

Im Vergleich zu verdünntem Sperma mit 2 % Glycerinendkonzentration wurden bei unverdünntem Samen durch 2 % Glycerin sowohl nach Abkühlung als auch nach Tiefgefrierung extrem höhere Werte für die extrahierbare Akrosinaktivität und den Prozentsatz geschädigter Akrosomen gefunden ($P \leq 0,01$). Dagegen lag die extrazelluläre GOT-Aktivität unverdünnter Spermaproben mit 2 % Glycerin nur nach dem Tiefgefrieren höher als bei verdünntem Samen mit gleicher Glycerinendkonzentration ($P \leq 0,01$).

Der Zusatz von mehr als 2 % Glycerin zu verdünntem Sperma bewirkte eine gewisse Zunahme der extrahierbaren Akrosinaktivität ($P > 0,05$), des GOT-Gehaltes ($P > 0,05$), jedoch einen deutlichen Anstieg des Prozentsatzes morphologisch geschädigter Akrosomen ($P \leq 0,01$).

Rasches Auftauen der Spermien (innerhalb 40 Sekunden bei $+40^{\circ}\text{C}$ oder $+60^{\circ}\text{C}$) setzte, bei Verwendung der Akrosinaktivität und der Akrosomenmorphologie als Beurteilungskriterien der Spermischädigung, weniger Läsionen als langsames Auftauen. Eine Beeinflussung der extrazellulären GOT-Aktivität durch

unterschiedliche Auftaumethoden konnte nicht festgestellt werden ($P > 0,05$).

Die Messung der Akrosinaktivität erlaubt es, Schäden an Eberspermien beim Tiefgefrierprozess objektiv zu erfassen, die bisher nur durch die weitgehend qualitative Beurteilung der Akrosomenmorphologie angesprochen werden konnten.

SUMMARY

The determination of acrosin was used to find out whether the acrosomal proteinase could provide further information on the effect of deep freezing preservation on boar spermatozoa as compared to the evaluation of the GOT and the morphological state of the acrosome.

After acid extraction of acrosin the acrosin activity was determined quantitatively using the combined BAEE/ADH test assay. In addition the determination of the extracellular GOT was carried out using the UV-Mono-Test system (Fa. BOEHRINGER). The percentage of damaged acrosomes employing unfixed and unstained spermatozoa immobilized in buffered formole salt medium was evaluated.

Employing native glyzerolized sperm as well as diluted semen samples with 2, 4 and 6 % glyzerol in a final concentration the three parameters were investigated.

Using a split sample procedure in two batches three ejaculates of three boars were examined.

Cooling of diluted spermatozoa to $+15^{\circ}\text{C}$ caused an increase of both acrosin activity ($p \leq 0.01$) and percentage of damaged acrosomes ($p \leq 0.01$). In contrary only a small increase of GOT activity was observed ($p > 0.05$).

Deep freezing process resulted in an increase of the extracellular GOT-activity ($p \leq 0.01$) and the percentage of damaged acrosomes ($p \leq 0.01$). However the extractable acrosin activity was not affected, corresponding with the enzyme values found at $+5^{\circ}\text{C}$ after cooling of the spermatozoa ($p > 0.05$).

As compared to diluted sperm suspended in egg yolk and glycerol both undiluted and glycerolized semen samples showed an extremely higher amount in extractable acrosin activity and percentage damaged acrosomes. after coling and deep freezing ($p \leq 0.01$). With respect to the extracellular GOT only deep freezing of the sperm caused a clear increase in enzyme activity of both undiluted and glycerolized semen as compared to diluted sperm samples ($p \leq 0.01$).

The admixture of more than 2 % glyzerol to diluted sperm resulted in an increase of the extractable acrosin activity ($p \leq 0.05$) as well as an increase in the percentage of morphologically altered acrosomes ($p \leq 0.01$).

Rapid thawing of the sperm cells on $+40^{\circ}\text{C}$ or $+60^{\circ}\text{C}$ within 40 sec had a less detremental effect on the spermatozoa as compared to a slow thawing procedure (several min) using the acrosin activity as well as the acrosomal morphology as parameters of cell damaging. The GOT activity was not influenced by the different thawing procedures ($p > 0.05$).

The determination of the acrosin activity yields more objective information on the degree of cell damaging during deep freezing preservation of boar spermatozoa than the qualitative estimation of acrosomal morphology.

6. STATISTISCHER UND TABELLARISCHER ANHANG

Tab. 1: Extrazellulär vorhandene GOT-Aktivität
(mU/10⁸Spermien) aus nativem, glyzerinisiertem
(2 % Glyzerinendkonzentration) und verdünntem
Ebersperma (Verdünner A; 2 % Glyzerinendkonzentration)
bei +38°C, +15°C, +5°C sowie nach dem Auftauen mit Methode I.

Berechnung und statistische Überprüfung
(Tukey-Test) der Differenzen zwischen den Gruppen

$\bar{x}$ = Durchschnittliche GOT-Aktivität aus
n = 9 Ejakulaten

** = $P \leq 0,01$

* = $P \leq 0,05$

	+38°C	+15°C C	+15°C A	+15°C G	+15°C -	+5°C A	+5°C G	+5°C -	-196°C A	-196°C G	Auftaumethode I -196°C
$\bar{x}$	2,1	5,6	9,2	3,8	11,6	17,6	9,5	28,7	83,4	59,9	
$\pm s$	0,5	2,4	3,1	1,4	2,1	4,3	3,2	5,9	25,8	23,9	
+38°C	--										
+15°C A	3,5	--									
+15°C G	7,1	3,6	--								
+15°C -	1,7	1,8	5,4	--							
+5°C A	9,5	6,0	2,4	7,8	--						
+5°C G	15,5	12,0	8,4	13,8	6,0	--					
+5°C -	7,4	3,9	0,3	5,7	2,1	8,1	--				
-196°C A	26,6** 5,9	23,1**	19,5*	24,9**	17,1	11,1	19,2*	--			
-196°C G	81,3**	77,8**	74,2**	79,6**	71,8**	65,8**	73,9**	54,7**	--		
-196°C -	57,8**	54,3**	50,7**	56,1**	48,3**	42,3**	50,4**	31,2**	23,5**	--	

Tab. 2: Prozentsatz geschädigter Akrosomen aus nativem, glyzerinisiertem (2 % Glyzerinendkonzentration) und verdünntem Ebersperma (Verdünner A; 2 % Glyzerinendkonzentration) bei $+38^{\circ}\text{C}$, $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ sowie nach dem Auftauen mit Methode I.

Berechnung und statistische Überprüfung (Tukey-Test) der Differenzen zwischen den Gruppen.

$\bar{x}$ = Durchschnittlicher Prozentsatz geschädigter Akrosomen aus $n = 9$ Ejakulaten

$** \leq P = 0,01$

$* \leq P = 0,05$

Aufbaumethode I

	+38°C	+15°C A	+15°C G	+15°C -	+5°C A	+5°C G	+5°C -	-196°C A	-196°C G	-196°C -
$\bar{x} \pm s$										
+38°C	0,3 0,2									
	--									
+15°C A	0,4	--								
+15°C G	2,6**	2,2**	--							
+15°C -	1,0*	0,6	1,6**	--						
+5°C A	1,9**	1,5**	0,7	0,9	--					
+5°C G	14,0**	13,6**	11,4**	13,0**	12,1**	--				
+5°C -	8,9**	8,5**	6,3**	7,9**	7,0**	5,1**	--			
-196°C A	67,7**	67,3**	65,1**	66,7**	65,8**	53,7**	58,8**	--		
-196°C G	99,1**	98,7**	96,5**	98,1**	97,2**	85,1**	90,2**	31,4**	--	
-196°C -	98,3**	97,9**	95,7**	97,3**	96,4**	84,3**	89,4**	30,6**	0,8	--

Tab. 3: Extrahierbare Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus nativem, glyzerinisiertem (2 % Glyzerinendkonzentration) und verdünntem Ebersperma (Verdünner A; 2 % Glyzerinendkonzentration) bei $+38^\circ\text{C}$, $+15^\circ\text{C}$, $+5^\circ\text{C}$ sowie nach dem Auftauen mit Methode I.

Berechnung und statistische Überprüfung (Tukey-Test) der Differenzen zwischen den Gruppen

$\bar{x}$ = Durchschnittliche Akrosinaktivität
aus $n = 9$ Ejakulaten

** = $P \leq 0,01$

* = $P \leq 0,05$

Auftaumethode I

	+38°C	+15°C A	+15°C G	+15°C -	+5°C A	+5°C G	+5°C -	-196°C A	-196°C G	-196°C -
$\bar{x}$	2183,3	729,8	3003,9	2598,8	1126,1	2564,8	2041,6	1619,3	3900,9	3346,3
$\pm s_x$	147,7	120,3	239,4	153,8	130,6	139,0	135,0	172,4	427,5	439,0
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
+38°C	2183,3	729,8	3003,9	2598,8	1126,1	2564,8	2041,6	1619,3	3900,9	3346,3
	147,7	120,3	239,4	153,8	130,6	139,0	135,0	172,4	427,5	439,0
+15°C A	1453,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
+15°C G	826,6	2280,1	--	--	--	--	--	--	--	--
+15°C -	415,5	1869,0	411,1	--	--	--	--	--	--	--
+5°C A	1057,2	396,3	1877,8	1472,7	--	--	--	--	--	--
+5°C G	381,5	1835,0	439,1	34,0	1438,7	--	--	--	--	--
+5°C -	141,7	1311,8	962,3	557,2	915,5	523,2	--	--	--	--
-196°C A	564,0	889,5	1384,6	979,5	493,2	945,5	422,3	--	--	--
-196°C G	1717,6	3171,1	897,0	1302,1	2774,8	1336,1	1859,3	2281,6	--	--
-196°C -	1163,0	2616,5	342,4	747,5	2220,2	781,5	1304,7	1727,0	554,5	--

Tab. 4: Extrazellulär vorhandene GOT-Aktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus nativem ($+38^\circ\text{C}$), bei $+38^\circ\text{C}$ verdünntem (Verdünner A; 2 % Glyzerinendkonzentration) und bei $+22^\circ\text{C}$ verdünntem (Verdünner A,B,C - 2, 4, 6% Glyzerinendkonzentration) Ebersperma während der Abkühlung bei $+15^\circ\text{C}$, $+5^\circ\text{C}$ sowie nach dem Auftauen mit den Methoden II, III und IV.

Berechnung und statistische Überprüfung (Tukey-Test) der Differenzen zwischen den Gruppen

$\bar{x}$ = Durchschnittliche GOT-Aktivität
aus $n = 9$ Ejakulaten

** = $P \leq 0,01$

* = $P \leq 0,05$

	+38°	+38° A	+15° A	+15° B	+15° C	+5° A	+5° B	+5° C	Aufbaumethode II			Aufbaumethode III			Aufbaumethode IV		
									A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	2,2	5,6	6,3	11,1	14,6	11,9	14,1	18,6	24,2	27,1	28,3	26,8	27,5	29,8	20,5	22,1	26,0
±	1,2	3,1	2,9	3,0	5,0	5,2	3,6	5,2	4,0	6,1	5,5	5,3	7,3	8,6	3,2	7,0	8,8
±38°	2,2																
±38° A	3,4	--															
±15° A	4,1	0,7	--														
±15° B	8,9	5,5	4,8	--													
±15° C	12,4	9,0	8,3	3,5	--												
±5° A	9,7	6,3	5,6	0,8	2,7	--											
±5° B	11,9	8,5	7,8	3,0	0,5	2,2	--										
±5° C	16,4	13,0	12,3	7,5	4,0	6,7	4,5	--									
II A	22,0	18,6	17,9	13,1	9,4	12,3	10,1	5,6	--								
II B	24,9	21,5	20,8	16,0	12,5	15,2	13,0	8,5	2,9	--							
II C	26,1	22,7	22,0	17,2	13,7	16,4	14,2	9,7	4,1	1,2	--						
III A	24,6	21,2	20,5	15,7	12,2	14,9	12,7	8,2	2,6	0,3	1,5	--					
III B	25,3	21,9	21,2	16,4	12,9	15,6	13,3	8,9	3,3	0,4	0,8	0,7	--				
III C	27,6	24,2	23,5	18,7	15,2	17,9	15,7	11,2	5,6	2,7	1,5	3,0	2,3	--			
IV A	18,3	14,9	14,2	9,4	5,9	8,6	6,4	1,9	3,7	6,6	7,8	6,3	7,0	9,3	--		
IV B	19,9	16,5	15,8	11,0	7,5	10,2	8,0	3,5	2,1	5,0	6,2	4,7	5,4	7,7	1,6	--	
IV C	23,8	20,4	19,7	14,9	11,4	14,1	11,9	7,4	1,8	1,1	2,3	0,8	1,5	1,8	5,5	3,9	--

Tab. 5: Prozentsatz geschädigter Akrosomen aus nativem ($+38^{\circ}\text{C}$), bei $+38^{\circ}\text{C}$ verdünntem (Verdünner A; 2 % Glyzerinendkonzentration) und bei $+22^{\circ}\text{C}$ verdünntem (Verdünner A,B,C - 2, 4, 6 % Glyzerinendkonzentration) Ebersperma während der Abkühlung bei $+15^{\circ}\text{C}$, $+5^{\circ}\text{C}$ sowie nach dem Auftauen mit den Methoden II, III und IV.

Berechnung und statistische Überprüfung (Tukey-Test) der Differenzen zwischen den Gruppen

$\bar{x}$ = Durchschnittlicher Prozentsatz geschädigter Akrosomen aus $n = 9$ Ejakulaten

**= $P \leq 0,01$

* = $P \leq 0,05$

	+38 ⁰	+36 ⁰ A	+15 ⁰ A	+15 ⁰ B	+15 ⁰ C	+5 ⁰ A + 5 ⁰ B + 5 ⁰ C	Aufbaumethode II B	Aufbaumethode III A	Aufbaumethode IV A
X	0,4 0,1	0,9 0,1	1,1 0,1	2,6 0,1	4,1 0,1	7,3 0,1	61,2 1,3	83,4 1,8	73,7 1,3
+38 ⁰	--	--	--	--	--	--	--	--	--
+38 ⁰ A	0,2	--	--	--	--	--	--	--	--
+15 ⁰ A	0,7	0,5	--	--	--	--	--	--	--
+15 ⁰ B	2,2	2,0	1,5	--	--	--	--	--	--
+15 ⁰ C	3,7	3,5	3,0	1,5	--	--	--	--	--
+5 ⁰ A	2,7	2,5	2,0	0,5	1,0	--	--	--	--
+5 ⁰ B	5,7	5,1	4,6	3,1	1,6	--	--	--	--
+5 ⁰ C	6,9	6,7	6,2	4,7	3,2	1,6	5,5	1,8	1,3
II A	61,2 1,3	60,6	60,1	58,6	57,1	58,2	55,5	53,9	53,7
B	76,4 1,1	75,8	75,3	73,8	72,3	73,3	70,7	69,1	68,7
C	88,7 3,3	88,1	87,6	86,1	84,6	85,6	83,0	81,4	80,7
III A	83,0 1,8	82,2	82,3	80,8	79,3	80,3	77,7	76,1	75,7
B	90,2 2,2	89,6	89,1	87,6	86,1	87,7	84,5	82,9	82,7
C	97,6 1,2	97,2	97,0	95,0	93,5	94,5	91,9	90,3	89,7
IV A	53,7 1,3	53,3	53,1	51,1	49,6	50,6	48,0	46,4	45,9
B	68,0 2,7	67,6	67,4	65,4	63,9	64,9	62,3	60,7	60,3
C	84,7 3,1	84,1	83,6	82,1	80,6	81,6	79,0	77,4	76,7

Tab. 6: Extrahierbare Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus nativem ($+38^\circ\text{C}$), bei $+38^\circ\text{C}$ verdünntem (Verdünner A; 2 % Glyzerinendkonzentration) und bei $+22^\circ\text{C}$ verdünntem (Verdünner A,B,C - 2, 4, 6 % Glyzerinendkonzentration) Ebersperma während der Abkühlung bei $+15^\circ\text{C}$, $+5^\circ\text{C}$ sowie nach dem Auftauen mit den Methoden II, III und IV.

Berechnung und statistische Überprüfung (Tukey-Test) der Differenzen zwischen den Gruppen

$\bar{x}$ = Durchschnittliche Akrosinaktivität
aus $n = 9$ Ejakulaten

**= $P \leq 0,01$

* = $P \leq 0,05$

[illegible]

Tab. 7: Prozentsatz geschädigter Akrosomen aus verdünntem (Verdünnern A,B,C - 2, 4, 6 % Glycerinendkonzentration) und mit den Methoden I - IV aufgetauten Spermien.

Berechnung und statistische Überprüfung
(Tukey-Test) der Differenzen zwischen
den Gruppen

$\bar{x}$ = Durchschnittlicher Prozentsatz geschädigter Akrosomen aus $n = 9$ Ejakulaten

**= $P \leq 0,01$

* = $P \leq 0,05$

		I A	II A	II B	II C	III A	III B	III C	IV A	IV B	IV C
$\bar{x}$		68,0	61,2	76,4	88,7	83,4	90,2	97,6	53,7	68,0	84,7
$\pm s$		0,7	2,1	1,8	1,3	1,3	2,2	2,7	3,3	1,2	3,2
I A	68,0 0,7	--									
II A	61,2 2,1	6,8 ^{**}	--								
II B	76,4 1,8	8,4 ^{**}	15,2 ^{**}	--							
II C	88,7 1,3	20,7 ^{**}	27,5 ^{**}	12,3 ^{**}	--						
III A	83,4 1,3	15,4 ^{**}	22,2 ^{**}	7,0 ^{**}	5,3 ^{**}	--					
III B	90,2 2,2	22,2 ^{**}	29,0 ^{**}	13,8 ^{**}	1,5	6,8 ^{**}	--				
III C	97,6 2,7	29,0 ^{**}	36,4 ^{**}	21,2 ^{**}	8,9 ^{**}	14,2 ^{**}	7,4 ^{**}	--			
IV A	53,7 3,3	14,3 ^{**}	7,5 ^{**}	22,7 ^{**}	25,0 ^{**}	29,7 ^{**}	36,5 ^{**}	43,9 ^{**}	--		
IV B	68,0 1,2	0,0	6,8 ^{**}	8,4 ^{**}	20,7 ^{**}	15,4 ^{**}	22,2 ^{**}	29,6 ^{**}	14,3 ^{**}		
IV C	84,7 3,2	16,7 ^{**}	23,5 ^{**}	8,3 ^{**}	4,0	1,3	5,5 ^{**}	12,9 ^{**}	31,0 ^{**}	16,7 ^{**}	--

Tab. 8: Extrahierbare Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^8$ Spermien) aus verdünntem (Verdüner A,B,C - 2, 4, 6 % Glyzerinendkonzentration) und mit den Methoden I - IV aufgetauten Spermien

Berechnung und statistische Überprüfung
(Tukey-Test) der Differenzen zwischen
den Gruppen

$\bar{x}$ = Durchschnittliche Akrosinaktivität
aus $n = 9$ Ejakulaten

**= $P \leq 0,01$

* = $P \leq 0,05$

	$\bar{x}$	I A	II A	II B	II C	III A	III B	III C	IV A	IV B	IV C
I	A	1619,3 172,4	887,0 53,5	1093,2 85,8	1276,4 152,8	1289,5 144,6	1452,1 215,8	1664,7 148,0	910,3 46,2	1007,8 63,6	1219,6 96,8
II	A	887,0 53,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
B	1093,2 85,8	526,0	206,2	--	--	--	--	--	--	--	--
C	1276,4 152,8	342,9	389,4	183,2	--	--	--	--	--	--	--
III	A	1289,5 144,6	411,5	196,3	13,1	--	--	--	--	--	--
B	1452,1 215,8	167,2	565,1	358,9	175,7	162,6	--	--	--	--	--
C	1664,7 148,0	45,4	777,7 ^{**}	571,5	388,3	375,2	212,6	--	--	--	--
IV	A	910,3 46,2	709,0 ^{**}	23,3	366,1	379,2	541,8	754,4 ^{**}	--	--	--
B	1007,8 63,6	611,5 [*]	120,8	85,4	268,6	281,7	484,3	656,9 [*]	97,5	--	--
C	1219,6 96,8	399,7	332,6	126,4	56,8	69,9	232,5	445,1	309,3	211,8	--

Tab. 7a: Vergleich der Akrosinaktivitäten
(mU/10⁸ Spermien) von aufgetautem Sperma
Gruppenweise Abtestung der Konfidenzinter-
valle zwischen den Gruppen I und IV
(Scheffé-Test)

Hypothese	Gruppe	n	Differenz	Signifikanz
H ₀	II/IV - I/III	36	440,7	**

Tab. 8a: Vergleich des Prozentsatzes geschädigter
Akrosomen von aufgetautem Sperma
Gruppenweise Abtestung der Konfidenzinter-
valle zwischen den Gruppen I bis IV
(Scheffé-Test)

Hypothese	Gruppe	n	Differenz	Signifikanz
H ₀	I/II - II/IV	36	10,3	**
H ₀	IV - I/II/III	36	14,9	**

Tab. 9: Korrelationen zwischen Akrosin- und GOT-Aktivität sowie Akrosomenschäden unter Einbeziehung der Werte für Nativ-, glyzerinisiertes und verdünntes (Verdünner A, 2 % Glycerinkonzentration) Sperma während der Abkühlung und Tiefgefrierung (Abb.2 bis 4, 11)

Statistisches Testsystem: Korrelation

Akrosinaktivität - GOT-Aktivität

$$\begin{aligned} r &= +0,67 \\ F &= 6,46 \\ P &\leq 0,05 = 5,32^* \end{aligned}$$

Akrosinaktivität ~ Akrosomenschäden

$$\begin{aligned} r &= +0,60 \\ F &= 4,50 \\ P &> 0,05 = 5,32 \end{aligned}$$

Akrosomenschäden - GOT-Aktivität

$$\begin{aligned} r &= +0,95 \\ F &= 72,0 \\ P &\leq 0,01 = 11,26^{**} \end{aligned}$$

Tab. 10: Korrelationen zwischen Akrosin- und GOT-Aktivität sowie Akrosomenschäden unter Einbeziehung der Werte für Nativ- und verdünntes (Verdünner A, B und C; 2, 4 und 6 % Glycerinendkonzentration) Sperma während der Abkühlung und Tiefgefrierung (Abb. 5 bis 7, 12)

Statistisches Testsystem: Korrelation

Akrosinaktivität - GOT-Aktivität

$$\begin{aligned} r &= +0,29 \\ F &= 1,43 \\ P &> 0,05 = 4,54 \end{aligned}$$

Akrosinaktivität - Akrosomenschäden

$$\begin{aligned} r &= +0,37 \\ F &= 2,44 \\ P &> 0,05 = 4,54 \end{aligned}$$

Akrosomenschäden - GOT-Aktivität

$$\begin{aligned} r &= +0,94 \\ F &= 122,49 \\ P &\leq 0,01 = 8,68^{**} \end{aligned}$$

7. LITERATURVERZEICHNIS

- AAMDAL, J.; HOGSET, I.; SVEBERG, O. und N. KOPPANG (1958)
A new type of artificial vagina and
a new collection technique for boar
semen
J.Am.Vet.Med.Ass. 132: 101
- ADAM, J.; SCHAF, J.-H. und H. ENKE (1971)
Methoden der statistischen Analyse in Me-
dizin und Biologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- ALLISON, A. (1967)
Lysosomes and disease
Scientific American 217: 62
- ALLISON, A.C. und E.F. HARTREE (1970)
Lysosomal enzymes in the acrosome and their
possible role in fertilization
J.Reprod.Fert. 21: 501
- AUSTIN, CR. (1969)
Sperm capacitation - Biological significance
in various species
In: Advances in the Biosciences 4: 1
Schering Symposium 1969, Pergamon Press
- AUSTIN, CR. und M.W.H. BISHOP (1958a)
Role of the rodent acrosome and perfora-
torium in fertilization
Proc.roy.Soc.-B 149: 241

- AUSTIN, CR. und M.W.H. BISHOP (1958b)
Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa
Proc.roy.Soc.-B 149: 241
- BADER, H. (1964)
Untersuchungen über den Einfluss unterschiedlicher Abkühlungsgeschwindigkeiten beim Tiefgefrieren von Ebersperma auf die Bewegungsaktivität der Samenzellen
Vet.med.Diss., Hannover
- BAIER, W. (1962)
Erfahrungen in der künstlichen Besamung des Hausschweines einschliesslich der Verwendung von Tiefkühl Samen
Zootec.Vet. 17: 94
- BAKER, R.D. und A.A. DEGEN (1972)
Transport of live and dead boar spermatozoa within the reproductive tract of gilts
J.Reprod.Fert. 28: 369
- BAMBA, K.; TADASHI, T.; KOJIMA, Y. und I.IIDA (1968a)
Studies on deep-freezing of boar semen:
VI. Effects of rapid freezing on survival of boar spermatozoa
Jap.J.Anim.Reprod. 14: 60
- BAMBA, K.; KOJIMA, Y. und I. IIDA (1968b)
Studies on deep-freezing of boar semen.
V. Effect of honey-yolk diluent on the liveability of frozen boar spermatozoa
Jap.J.Zootech.Sci. 39: 415

BANE, A. und L. NICANDER (1963)

The structure and formation of the perforatorium in mammalian sperm
Int.J.Fert. 81: 865

BARROS, C.; BEDFORD, J.M.; FRANKLIN, L.E. und CR. AUSTIN

(1967)

Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction
J.Cell.Biol. 34: C1

BEDFORD, J.M. (1969)

Morphological aspects of sperm capacitation in mammals

In: Advances in Biosciences 4: 35

Schering Symposium 1969, Pergamon Press

BEDFORD, J.M. (1970)

Sperm capacitation and fertilization in mammals

Biol.Reprod.Supplement 2: 128

BERGMEYER, H.U. (1970)

Methoden der enzymatischen Analyse

Verlag: Chemie Weinheim, 2.Aufl. 685

BISHOP, M.W.H. und CR. AUSTIN (1957)

Die Spermien der Säuger

Endeavour 16: 137

BOEHNKE, H.J.; HAHN, R.; HILLMANN, K.H.; TREU, H.;
LORRMANN, W. und H.F. ZODER (1974)

Zur Tiefgefrierung von Ebersperma
3. Mitteilung: Weitere Labor- und weitere
Besamungsversuche unter Verwendung von TEST-
und TESNAK-Verdüner sowie verschiedenen
Auftaumethoden
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 14: 236

BOENDER, J. (1968)

Morphological changes of the acrosome of
boar spermatozoa during aging and cold shock
VI^e Cong.Intern.Reprod.Anim.Insem.Artif.,
Paris, Vol.II. 1217

BOWER, R.E.; CRABO, B.G.; PACE, M.M. und E.F. GRAHAM (1973)

Effects of dilution and glycerol on the
release of Glutamic-Oxalacetic-Transaminase
(GOT) from boar spermatozoa
J.Anim.Sci. 36: 319

BREEUWSMA, A.J. (1972)

The interrelationship between seminal gluta-
mic-oxalacetic transaminase and fertility
in bulls
VII.Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes.
München, Vol.III. 2129

BROWN, K.I.; CRABO, B.G.; GRAHAM, E.F. und M.M. PACE (1971)

Some factors affecting loss of intracellu-
lar enzymes from spermatozoa
Cryobiology 8: 220

- BROWN, C.R. und E.F. HARTREE (1974)
Distribution of a trypsin-like proteinase
in the ram spermatozoa
J.Reprod.Fert. 36: 195
- BUTTLE, H.R.L. und J.L. HANCOCK (1965)
Sterile boars with "knobbed" spermatozoa
J.Agric.Sci. 65: 255
- CHURCH, K.E. und C.N. GRAVES (1973)
Acrosomal proteinase loss after cold shock
of bovine sperm
J.Anim.Sci. 37: 304
- CONRAD, K.; BUCKLEY, J. und R. STAMBAUGH (1971)
Studies on the nature of the block to
polyspermy in rabbit ova
J.Reprod.Fert. 27: 133
- CRABO, BG. und C.F. GRAHAM (1972)
Correlation between some laboratory methods
for evaluation of boar semen after freezing
VII.Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes.
München, Vol.II. 1639
- CRABO, BG.; BOWER, R.G. und C.F. GRAHAM (1970)
The effect of glycerol on bull and boar
spermatozoa in vitro measured as loss of
intracellular glutamic-oxalacetic transami-
nase (GOT)
Proc.Scand.Vet.Congr., Bergen, 242
- CRABO, BG. und S. EINARSON (1971)
Fertility of deep frozen boar spermatozoa
Acta vet.scand. 12: 125

- CRABO, BG.; BROWN, K.I. und E.F. GRAHAM (1972a)
Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa
J.Anim.Sci. 35: 377
- CRABO, BG.; EINARSSON, S.; LAMM, A.M.; SOOSALM, O.
und S. VIRING (1972b)
Studies on the fertility of deep frozen boar spermatozoa
VII. Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes.
München, Vol. II. 1649
- DALRYMPLE, J.R. und J.W. MacPHERSON (1969)
Low temperature preservation of boar spermatozoa
Can.J.Anim.Sci. 49: 45
- DUKELOW, W.R. und E.F. GRAHAM (1962)
Freezing of porcine semen
J.Anim.Sci. 21: 1020 (Abs. 227)
- EINARSSON, S.; SOOSALU, O.; SWENSSON, T. und S. VIRING
(1972)
On the fertility and survival of deep frozen boar spermatozoa thawed in skim milk
Acta vet.scand. 13: 446
- EINARSSON, S. und S. VIRING (1973)
Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination
J.Reprod.Fert. 32: 117

EINARSSON, S.; HOLTMAN, M.; SOOSALU, O.; SWENSSON, T.
und S. VIRING (1974)

Studies on the fertility and survival of
deep-frozen boar spermatozoa thawed in
four different diluents

Zuchthyg. 2: 40

FINK, E.; SCHIESSLER, H.; ARNHOLD, M. und H. FRITZ (1972)

Isolierung eines Trypsin-ähnlichen Enzyms
(Akrosin) aus Eberspermien

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1633

FLIPSE, R.J. (1960)

Metabolism of bovine semen: GOT and GPT
activities

J.Dairy Sci. 43: 773

FRANKLIN, L.E.; BARROS, C. und E.N. FUSSEL (1968)

Fine structure of the acrosomal region of
golden hamster spermatozoa and the acrosome
reaction

J.Cell.Biol. 39: 46a (Abs. 109)

FRANKLIN, L.E.; BARROS, C. und E.N.FUSSEL (1970)

The acrosomal region and the acrosome reac-
tion in sperm of the golden hamster

Biol.Reprod. 31: 180

FRITZ, H.; FINK, E. und R. MARX (1971)

Ansatzpunkte für eine antienzymatische Kon-
trazeption

In: Sexualhormone und Blutgerinnung, XIV.

Hamburger Symposium über Blutgerinnung

Eds.: Marx, R. und H.A. Thies, Verlag

Schattauer, F.K., Stuttgart, N.Y.

FRITZ, H.; FÖRG-BREY, B.; FINK, E.; SCHIESSLER, H.;
JAUMANN, E. und M. ARNHOLD (1972a)

Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen
Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch
ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-
Proteinase-Inhibitoren

I. Seminale Trypsin-Inhibitoren und Trypsin-
Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1007

FRITZ, H.; FÖRG-BREY, B.; SCHIESSLER, H.; ARNHOLD, M.
und E. FINK (1972b)

Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen
Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch
ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-
Proteinase-Inhibitoren

II. Inhibitoren aus Blutegeln, Sojabohnen, Erd-
nüssen, Rinderkolostrum und Seeanemonen
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1010

FRITZ, H.; SCHIESSLER, H.; FÖRG-BREY, B.; TSCHECHE, H.
und E. FINK (1972c)

Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen
Proteinase (Akrosin) aus Eberspermien durch
ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-
Proteinase-Inhibitoren

III. Inhibitoren aus Bauchspeicheldrüsen
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1013

FRITZ, H.; FÖRG-BREY, B.; MEIER, M.; ARNHOLD, M. und
H. TSCHECHE (1972d)

Humanakrosin: Hemmbarkeit durch Protein-
Proteinase-Inhibitoren

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1950

FRITZ, H.; FÖRG-BREY, B.; FINK, E.; MEIER, M.; SCHIESSLER, H.
und C. SCHIRREN (1972e)

Humanakrosin: Gewinnung und Eigenschaften
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1943

FRITZ, H.; SCHIESSLER, H. und W.D. SCHLEUNING (1972f)
Proteinases and proteinase inhibitors in
the fertilization process: new concepts of
control

In: Advances in the Biosciences 10 Perga-
mon Press.Ed.Gerhard Raspe

FRITZ, H.; SCHLEUNING, W.D.; SCHILL, W.B.; SCHIESSLER, H.;
WENDT, V. und G. WINKLER (1975)

Boar, bull and human sperm acrosin-isolation,
properties and biological aspects

In: Proteases and Biological Control (E.Reich,
D.Rifkin and E.Shaw, eds.), Cold Spring Harbour
Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.,p.715

GARNER, D.L. (1973)

Partial characterization of bovine acro-
somal proteinase

Biol.Reprod. 2: 71

GARNER, D.L. und R.F. CULLISON (1974)

Partial purification of bovine acrosin
by affinity chromatography

J.Chromat. 92: 445

GRAHAM, E.F. und M.M. PACE (1967)

Some biochemical changes in spermatozoa
due to freezing

Cryobiology. 4: 75

- GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L. und M. MAKI-LAURILA (1970)
Some physical and chemical methods of
evaluating semen
3rd.Tech.Conf.A.i.Reprod., N.A.A.B.Chicago, 44
- GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L.; MAKI-LAURILA, M. und R.E. BOWER (1971a)
Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen
A.I.Digest. 19(1): 12
- GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHMEHL, M.K.L., MAKI-LAURILA, M. und R.E. BOWER (1971b)
Fertility studies with frozen boar spermatozoa
A.I.Digest. 19(6): 6
- GRAHAM, E.F. und B. CRABO (1972)
Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa
VII.Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes. München, Vol. II., 1629
- GROVE, D.; BOLLWAHN, W. und B. MAHLER (1968)
Versuche zur Gewinnung und Tiefgefrierkonservierung von Nebenhodenschwanzsperma beim Eber
Dt. Tierärztl.Wschr. 2: 35
- GWATKIN, R.B.L.; WILLIAMS, D.T.; HARTMANN, J.F. und M. KNIAZUK (1973)
The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules
J.Reprod.Fert. 32: 259

HADEK, R. (1963)

Submicroscopic changes in the penetrating
spermatozoa of the rabbit
J.Ultrastruc.Res. 8: 161

HAHN, R.; LORRMANN, W. und H.F. ZODER (1974)

Zur Tiefgefrierung von Ebersperma
2. Mitteilung: Besamungsversuche unter
Verwendung von TEST- und TESNaK-Verdüner
sowie verschiedenen Auftaumethoden
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 13: 281

HANCOCK, J.L. (1953)

The spermatozoa of sterile bulls
J.Exp.Biol. 30: 50

HANCOCK, J.L. (1956)

The morphology of boar spermatozoa
J.R.Micr.Soc. 76: 84

HARTMANN, J.F. und R.B.L. GWATKIN (1971)

Alteration of sites on the mammalian sperm
surface following capacitation
Nature, London, 234: 479

HEALEY, P. (1969)

Effect of freezing on the ultrastructure of
the spermatozoon of some domestic animals
J.Reprod.Fert. 18: 21

HESS, E.A.; TEAGUE, T.M. und R.C. MARTIG (1957)

Swine can be bred with frozen semen
Ohio Farm and Home Research, 42: 309

- HESS, E.A.; LUDWICK, T.M. und H.S. TEAGUE (1960)
Motility of boar spermatozoa as influenced
by semen freezing procedures
J.Anim.Sci. 19: 926
- HO, J.J.L. und S. MEIZEL (1970)
Electrophoretic detections of multiple forms
of trypsin-like activity in spermatozoa of
the domestic fowl
J.Reprod.Fert. 23: 177
- HILLMANN, K.-H. (1972)
Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung
von Ebersamen mit dem Beltsville-F-3-Ver-
dünnern
Vet.Med.Diss., Hannover
- HILLMANN, K.-H. und H. TREU (1973)
Zur Tiefgefrierung von Ebersperma
1. Mitteilung: Darstellung und Messung mor-
phologischer und enzymatischer Veränderun-
gen beim Tiefgefrieren von Eberspermien
Zuchthyg. 8: 105
- HILLMANN, K.-H. und H. TREU (1974)
Zum Vorkommen der Glutamat-Oxalacetat-Trans-
aminase in Hengstsamen und ihre Beziehung
zu anderen Eigenschaften des Spermas
Zuchthyg. 2: 129
- HOFFMANN, H.H. (1959)
Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens
Vet.Med.Diss., München

- HOOD, R.D.; FOLEY, C.W. und T.G. MARTIN (1970)
Effects of cold shock, dilution, glycerol
and Dimethyl-Sulfoxide on cation concentra-
tion in porcine spermatozoa
J.Anim.Sci. 30: 91
- HUANG-YANG, Y.H.J. und S. MEIZEL (1975)
Purification of rabbit testis proacrosin
and studies of its active form
Biol.Reprod. (in Vorbereitung)
- IIDA, I. und K. IKEDA (1966)
Studies on deep-freezing of boar semen
II. Effect of various rapid freezing rates
on survival of boar spermatozoa
Jap.J.Zootech.Sci. 37(11): 417
- IIDA, I. und T. ADACHI (1966)
Studies on deep-freezing of boar semen
I. Effect of various diluents, glycerol
levels and glycerol equilibration periods
on deep-freezing of boar spermatozoa
Jap.J.Zootech.Sci. 37(11): 411
- JONES, R.C. (1972)
Ultrastruktur des Kopfes von frisch gewon-
nenen und gelagerten Spermatozoen
VII. Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes.
München, Vol.I., 443

JONES, R.C. (1973a)

Changes occurring in the head of boar spermatozoa: vesiculation or vacuolation of the acrosome

J.Reprod.Fert. 35: 113

JONES, R.C. (1973b)

The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa

J.Reprod.Fert. 35: 179

JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G. und N. CHANEY (1974)

Boar spermatozoa acrosomal proteinase loss during freezing

J.Anim.Sci. 39(1): 213

KATTUS, A.A. (1956)

Serumaminopherase (Transaminase) in diagnosis of acute myocardial infarction

J.Am.Med.Assoc. 160: 16

KING, G.J. und J.W. MacPHERSON (1966)

The effects of glycerol on fertility of liquid boar semen

A.I.Digest 14(12): 6

KOJIMA, Y.; IIDA, I. und K. BAMBA (1967)

Studies on deep-freezing of boar semen:

IV. Additional effects of DMSO as a protective agent

Jap.J.Anim.Reprod. 15(4): 149

- KUNZE, C.; SCHMIDT, D. und D. BIERWOLF (1972)
Morphological changes in the head of boar
spermatozoa during preservation by deep-
freezing
Mh.Vet.Med. 27(3): 103
- LADUE, J.S.; WROBELEWSKI, F. und A. KARMEN (1954)
Serum glutamic transaminase activity in
human acute transmural myocardial infarction
Science 120: 497
- LEIDL, W. (1968)
Neue Verfahren in der künstlichen Besamung
der Wirbeltiere
VI^e Cong.Intern.Reprod.Anim.Insem.Artif.,
Paris, Vol.II, 951
- LIESS, K. und D. KRAUSE (1958)
Zum Vorkommen des sogenannten Akrosom-Defek-
tes in Ebersperma
Dt.tierärztl.Wschrift 65: 677
- MEIZEL, S. und Y.H.J. HUANG-YANG (1973)
Further studies of an inactive form of a
trypsin-like enzyme in rabbit testes
Biochem.Biophys.Res.Comm. 53: 1145
- MEIZEL, S.; MUKERJA, S.K. und Y.H.J. HUANG-YANG (1974)
Biochemical studies of rabbit testes and
epididymal sperm proacrosin
J.Cell.Biol. 63: 222a

MUDRA, A. (1958)

Statistische Methoden für landwirtschaftliche Versuche

Paul Parey, Berlin und Hamburg

MULTAMÄKI, S. und M. NIEMI (1972)

Trypsin-like proteolytic activity in an acrosomal extract of bull spermatozoa

Int.J.Fert. 17: 43

NAGASE, H. und T. NIWA (1964)

Deep freezing bull semen in concentrated pellet form: I. Factors affecting survival of spermatozoa

V.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I., Trient

Vol. IV., 410

NAGASE, H.; GRAHAM, E.F. und T. NIWA (1964a)

Pelleted semen: The effect of glycerol level and composition of thawing solution on fertility of bovine spermatozoa

V.Int.Congr.Anim.Reprod.A.I., Trient

Vol. IV., 404

NAGASE, H.; NIWA, T.; YAMASHITA, S. und S. IVIE (1964b)

Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form: III. Fertility

V. Int.Congr.Anim.Reprod.A.I., Trient,

Vol. IV., 503

NAKAMURA, R.M. (1974)

(in Vorbereitung)

NEVILLE, W.J.; MacPHERSON, J.W. und G.J. KING (1970)

The contraceptive action of glycerol in gilts
J.Anim.Sci. 31: 277

NICANDER, L. und A. BANE (1962)

Fine structure of boar spermatozoa
Z.Zellf. 57: 390

NICANDER, L. und A. BANE (1966)

Fine structure of the sperm head in some
mammals, with particular reference to the
acrosome and the subacrosomal substance
Z.Zellf. 72: 496

PACE, M.M. und E.F. GRAHAM (1970)

The release of glutamic oxa acetic trans-
aminase from bovine spermatozoa as a test
method of assessing semen quality and
fertility
Biol.Reprod. 3: 140

PALM, S. und H. FRITZ (1975)

Fortschritte der Trasyloltherapie
F.W. Schattauer Verlag, in Druck

PAVLOK, A. und A. McLAREN (1972)

The role of cumulus cells and the zona
pellucida in fertilization of mouse
eggs in vitro
J.Reprod.Fert. 29: 91

PEDERSEN, H. (1972)

The acrosome of the human spermatozoa:
a new method for its extraction and an ana-
lysis of its trypsin-like enzyme
J.Reprod.Fert. 31: 99

PEDERSEN, H. und P.E. LEBECH (1971)

Ultrastructural changes in the human sper-
matozoon after freezing for artificial
insemination
Fert.Steril. 22: 125

POLAKOSKI, K.L. (1974)

Partial purification and characterization
of proacrosin from boar sperm
Fedn.Proc. 33: 1308 (Abs. 484)

POLAKOSKI, K.L. und W.L. WILLIAMS (1974)

Studies on the purification and charcteri-
zation of boar acrosin
In: Proteinase Inhibitors (Bayer Symposium
V), Proc.2nd Int.Res.Conf.Grosse Ledder, 1973
(eds. H.Fritz, H.Tscheche, L.J.Greene and
E.Truscheit) p.128, Springer Verlag, Berlin

- POLAKOSKI, K.L.; ZANEVELD, L.J.D. und W.L. WILLIAMS (1972a)
Purification of a proteolytic enzyme from
rabbit acrosomes
Biol.Reprod. 6: 23
- POLAKOSKI, K.L.; WILLIAMS, W.L. und R.A. McRORIE (1972b)
Purification and properties of acrosin,
an arginyl proteinase from sperm acrosomes
Fedn.Proc. 31: 366
- POLAKOSKI, K.L.; McRORIE, R.A. und W.L. WILLIAMS (1973)
Boar acrosin I. Purification and preliminary characterization of a proteinase from boar sperm acrosomes
J.Biol.Chem. 248: 8178
- POLGE, C. (1956)
Artificial insemination in pigs
Vet.Rec. 68: 62
- POLGE, C. (1959)
Some experiments on the preservation of boar semen
Ann.Zootechn. 8: 113
- POLGE, C.; SMITH, A.U. und A.S. PARKES (1949)
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures
Nature, 164: 666
- POLGE, C.; SALAMON, S. Und I. WILMUT (1970)
Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination
Vet.Rec. 87: 424

PURSEL, V.G. und L.A. JOHNSON (1971)

Procedure for the preservation of boar
spermatozoa by freezing
A.R.S., 44: 227

PURSEL, V.G. und L.A. JOHNSON (1972)

Fertility comparison of boar semen frozen
in two extenders
J.Anim.Sci. 35: 1123

PURSEL, V.G. und L.A. JOHNSON (1974a)

Frozen boar spermatozoa: Fertility with
concentrated semen and a new thawing pro-
cedure
J.Anim.Sci. 39: 222

PURSEL, V.G. und L.A. JOHNSON (1974b)

Frozen boar spermatozoa: methods
of thawing
J.Anim.Sci. 39: 222

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und R.J. GERRITS (1969a)

Effect of cold shock and freezing on ca-
tions of boar spermatozoa
J.Anim.Sci. 29: 196

- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und R.J. GERRITS (1969b)
Fertility test of boar spermatozoa frozen
by pellet method
J.Anim.Sci. 29: 196 (Abs. 368)
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und R.J. GERRITS (1969c)
GOT and LDH activities of boar spermatozoa and seminalplasma
J.Reprod.Fert. 18: 176
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und R.J. GERRITS (1970)
Distribution of glutamic oxalacetic transaminase and lactic dehydrogenase activities in boar semen after cold shock and freezing
Cryobiology. 7: 141
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und G.B. RAMPACEK (1972a)
Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock
J.Anim.Sci. 34: 278
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und L.L. SCHULMAN (1972b)
Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa
J.Anim.Sci. 35: 580
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und L.L. SCHULMAN (1972c)
Loss of sperm fertilizing capacity associated with altered acrosome morphology during in vitro storage
VII.Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes., München, Vol.II, 1597

- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und L.L. SCHULMAN (1973a)
Effect of dilution, seminal plasma and
incubation period on cold shock susceptibility
of boar spermatozoa
J.Anim.Sci. 37: 528
- PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L. und L.A. JOHNSON (1973b)
Effect of holding time on storage of boar
spermatozoa at 5°C
J.Anim.Sci. 37: 785
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. und L.L. SCHULMAN (1974)
Acrosome morphology of boar spermatozoa
during in vitro aging
J.Anim.Sci. 38: 113
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G. und K.W. CLELAND (1969)
Chemical and ultrastructural changes in
ram spermatozoa after washing, cold shock
and freezing
J.Reprod.Fert. 18: 209
- RÄTZ, K.H. und A. MATTHEUS (1972)
Untersuchungen über die Beziehungen zwischen
Transaminasekonzentration und anderen Pa-
rametern des Ejakulates
Andrologie 4(4): 355
- RICHTER, L. und A. LIEDICKE (1972)
Ein Verfahren zum Tiefgefrieren von Eber-
sperma
VII.Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes.,
München, Vol.II 1618

- ROHLOFF, D. (1967a)
Untersuchungen zur Konservierung von Ebersamen mit Dimethylsulfoxyd (DMSO)
Zuchthyg. 2: 112
- ROHLOFF, D. (1967b)
Tiefgefrierung von Ebersperma in Pelletform bei -196°C
Zuchthyg. 2: 75
- ROHLOFF, D. und G. ALLMELING (1970)
Beitrag zur Eberspermatiefgefrierung
Zuchthyg. 5: 88
- ROHLOFF, D. und G. ALLMELING (1971)
Zur Tiefgefrierung von Ebersamen
Berlin-Münchener tierärztl.Wschr. 84: 330
- ROMENY, E.; HILLMANN, K.-H. und L. RICHTER (1974a)
Zur Tiefgefrierung von Ebersperma
4. Mitteilung: Labor- und Besamungsversuche mit dem Hülsenberg-Verdünner IV
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 15: 353
- ROMENY, E.; TREU, H. und L. RICHTER (1974b)
Zur Tiefgefrierung von Ebersperma
5. Mitteilung: Labor- und Besamungsversuche zur Verbesserung des "Hülsenbergverfahrens"
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 16: 382
- ROMENY, E.; RICHTER, L. und K.F. WEITZE (1974c)
Zur Tiefgefrierung von Ebersperma
6. Mitteilung: Labor- und Besamungsversuche mit einem modifizierten Hülsenbergverdünner
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 21: 512

ROUSSEL, J.D. und O.T. STALLCUP (1965)

Parallelism between semen characteristics
and glutamic oxalacetic transaminase,
glutamic pyruvic transaminase activities
J.Dairy Sci. 48: 1684

ROY, A. (1955)

Storage of boar and stallion spermatozoa
in glycin-egg yolk medium
Vet.Rec. 67: 330

SAACKE, R.G. und C.E. MARSHALL (1968)

Observations on the acrosomal cap of fixed
and unfixed bovine spermatozoa
J.Reprod.Fert. 16: 511

SAACKE, R.G.; AMANN, R.R. und C.E. MARSHALL (1968)

Acrosomal cap abnormalities of sperm from
subfertile bulls
J.Anim.Sci. 27: 1391

SALAMON, S. (1973)

Deep freezing of boar spermatozoa
III. Effects of centrifugation, diluent and
dilution rate, pellet volume and method
of thawing on survival of spermatozoa
Aust.J.Biol.Sci. 26: 239

SALAMON, S. und D. VISSER (1972)

Insemination with frozen boar semen
VII. Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes.,
München, Vol. II, 1646

- SALAMON, S. und D. VISSER (1973)
Fertility test of frozen boar spermatozoa
Aust.Biol.Sci. 26: 291
- SALAMON, S. und D. VISSER (1974)
Fertility after surgical insemination
with frozen boar semen
J.Reprod.Fert. 36: 463
- SALAMON, S.; WILMUT, I. und C. POLGE (1973)
Deep freezing of boar semen
I. Effects of dilution composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa
Aust.J.Biol.Sci. 26: 219
- SANFORD, L.M.; KING, G.J. und J.W. MacPHERSON (1972)
Influence of glycerol concentration and freezing to -79°C on oxygene uptake and liveability of boar and bull spermatozoa
Can.J.Anim.Sci. 52: 65
- SCHEFELS, W.; BIEGERT, W. und W. LEIDL (1971)
Die Verteilung der Spermien im weiblichen Genitale des Schweines nach Insemination von frischem und tiefgefrorenem Sperma
Zuchthyg. 6(2): 60
- SCHIESSLER, H.; FRITZ, H.; ARNHOLD, M.; TSCHECHE, H. und E. FINK (1972)
Eigenschaften des Trypsin-ähnlichen Enzyms (Akrosin) aus Ebersperma
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353: 1638

SCHILL, W.-B. (1973a)

Acrosin activity in human spermatozoa:
methodological investigations
Arch.Derm.Forsch. 248: 257

SCHILL, W.-B. (1973b)

Der Einfluss kryobiologischer Behandlungen
von Humansperma auf die Aktivität der akro-
somalen Protease Akrosin
Andrologie 5(4): 333

SCHILL, W.-B. (1974a)

The influence of glycerol on the extractability
of acrosin from human spermatozoa
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 355: 225

SCHILL, W.-B. (1974b)

Quantitative determination of acrosin ac-
tivity in human spermatozoa
Fert.Steril. 25: 703

SCHILL, W.-B. und H.H. WOLFF (1974a)

Acrosin activity and acrosome ultrastruc-
ture of human spermatozoa after freeze
preservation
Die Naturwissenschaften 4: 172

SCHILL, W.-B. und H.H. WOLFF (1974b)

Ultrastructure of human sperm acrosome
and determination of acrosin activity under
conditions of semen preservation
Int.J.Fert. 19: 217

SCHILL, W.-B. und G.L. HABERLAND (1974)

Kinin-induced enhancement of sperm motility
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355: 229

SCHIRREN, C. und A. EWEIS (1973)

Akrosinaktivität in menschlichen Spermato-
zoen und Spermatozoendichte im Ejakulat
Andrologie 5: 81

SCHLEUNING, W.-D. und H. FRITZ (1974)

Some characteristics of highly purified
boar sperm acrosin
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355: 125

SCHLEUNING, W.-D.; SCHIESSLER, H. und H. FRITZ (1973)

Highly purified acrosomal proteinase
(boar acrosin): isolation by affinity
chromatography using benzamidine - cellu-
lose and stabilization
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354: 550

SCHÖRNER, G. (1974)

Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen
Wien.tierärztl.Mschr. 61(5): 141

SCHUMACHER, G.F.B. und L.J.D. ZANEVELD (1974)

Proteinase inhibitors in human cervical mucus
and their in vitro interactions with human
acrosin
In: Proteinase Inhibitors (Bayer Symposium
V), Proc. 2nd Int. Res. Conf., Grosse Ledder,
1973 (eds. H. Fritz, H. Tscheche, L.J. Greene
und E. Truscheit), p.178, Springer Verlag,
Berlin

- SEPPERGREEN, I. (1958)
Experiments in the deep freezing of boar semen at -79°C
S.Nordiska Veterinärmötet, Helsingfors, Sekt.D, 701
- SRIVASTAVA, P.N.; ADAMS, C.E. und E.F. HARTREE (1965)
Enzymatic action of acrosomal preparations on the rabbit ovum in vitro
J.Reprod.Fert. 10: 61
- SPAMNAUGH, R. und J. BUCKLEY (1968)
Zona pellucida dissolution enzymes of the rabbit sperm head
Science, 161: 585
- SPAMNAUGH, R. und J. BUCKLEY (1969)
Identification and subcellular localization of enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa
J.Reprod.Fert. 19: 423
- SPAMNAUGH, R. und J. BUCKLEY (1970)
Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus monkey and human spermatozoa
Biol.Reprod. 3: 275
- SPAMNAUGH, R. und J. BUCKLEY (1972a)
Histochemical subcellular localization of the acrosomal proteinase effecting dissolution of the zona pellucida using fluorescein-labeled inhibitors
Fert.Steril. 23: 348

- STAMBAUGH, R. und J. BUCKLEY (1972b)
Studies on acrosomal proteinase of rabbit
spermatozoa
Biochem.Biophys.Acta 284: 473
- TEICHMANN, R.J. und M.H. BERNSTEIN (1971)
Fine structure localization of acid phos-
phatase in rabbit and bull sperm heads
J.Reprod.Fert. 27: 243
- WEBER, E. (1972)
Grundriss der biologischen Statistik
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- WENDT, V. (1974)
Akrosinbestimmung bei Bullenspermien unter
besonderer Berücksichtigung des einzelnen
Spermiums
Vet.Med.Diss., München
- WHITE, A.A. und W.C. HESS (1958)
Some alterations in semen enzymes in pro-
gressive muscular dystrophy
Proc.Soc.Ex.Biol.Med. 94: 54
- WILMUT, I. und C. POLGE (1971)
Recent progress in the deep-freeze preservation
of boar semen
J.Reprod.Fert. 25: 301

- WILMUT, I. und C. POLGE (1972)
The freezing of boar spermatozoa
VII.Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes.,
München, Vol. II, 1612
- WILMUT, I. und C. POLGE (1974)
The fertilizing capacity of boar semen
stored in the presence of glycerol at
20°, 5° and - 79°C
J.Reprod.Fert. 38: 105
- WOHLFARTH, E. (1961)
Beitrag zum Akrosom-Defekt im Ebersperma
Zuchthyg. 5: 268
- ZANEVELD, L.J.D.; SRIVASTAVA, P.N. und W.L. WILLIAMS
(1969)
Relationships of a trypsin-like enzyme
in rabbit spermatozoa to capacitation
J.Reprod.Fert. 20: 337
- ZANEVELD, L.J.D. und W.L. WILLIAMS (1970)
A sperm enzyme that disperses the corona
radiata and its inhibition by decapaci-
tation factor
Biol.Reprod. 2: 363
- ZANEVELD, L.J.D. und K.L. POLAKOSKI (1971)
Characterisation of sperm acrosomal hya-
luronidase and acrosin
Biol.Reprod. 5: 85

ZANEVELD, L.J.D.; ROBERTSON, R.T.; WILLIAMS, W.L. und
M. KESSLER (1971a)

Inhibition of fertilization in vivo by
pancreatic and seminal plasma trypsin-inhibitor
J.Reprod.Fert. 25: 387

ZANEVELD, L.J.D.; POLAKOSKI, K.L.; FOLEY, C.W. und
W.L. WILLIAMS (1971b)

The role of acrosin, an acrosomal protease
and acrosin inhibitor in capacitation of
sperm
Fed.Proc. 30: 2241 (Abs. 595)

ZANEVELD, L.J.D.; POLAKOSKI, K.L. und W.L. WILLIAMS
(1972a)

Properties of a proteolytic enzyme from
rabbit sperm acrosomes
Biol.Reprod. 6: 30

ZANEVELD, L.J.D.; DRAGOJE, B.H. und G.F.B. SCHUMACHER
(1972b)

Acrosomal proteinase and proteinase inhibi-
tor of human spermatozoa
Science 177: 702

ZANEVELD, L.J.D.; POLAKOSKI, K.L. und G.F.B. SCHUMACHER
(1973)

Properties of acrosomal hyaluronidase
from bull spermatozoa; evidence for its
similarity to testicular hyaluronidase
J.Biol.Chem. 248: 564

Weiterhin wurden verwendet:

KARMEN, A. (1955)

Zitiert nach BERGMEYER, H.U. (1970):
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag: Chemie Weinheim, 2.Auflage. 685

KARG, H.; WALDSCHMIDT, M. und B. HOFFMANN (1964)

Desoxyribonuclease und eiweisspaltende
Enzyme in Geschlechtssekreten von Bul-
len
V.Int. Congr. Anim.Reprod.A.I., Trient,
Vol. III, 383

SCHIRREN, C.; LAUDAHN, G.; EWEISS, A. und I.HEINZE
(1974)

Morphologische und biochemische Unter-
suchungen im menschlichen Sperma: Akro-
som-Defekte, Akrosinaktivität und Human-
sperma-Inhibitor-Aktivität
Z.Hautkr. 49: 5

LEBENS LAUF

Als Sohn des Arztes Peter-Michel Klenner und seiner Ehefrau Edith Klenner, geb. Meinecke, wurde ich am 20. September 1943 in Lublin/Polen geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Witzenhausen/Werra und des Real-Gymnasiums in Bad Soden-Allendorf legte ich im Februar 1966 am Schubarth-Gymnasium in Aalen/Wttbg. das Abitur ab.

Nach anschliessender einjähriger Bundeswehrzeit begann ich im Sommersemester 1967 mit dem Studium der Tiermedizin an der Tiermedizinischen Hochschule der Universität München und beschloss dieses im November 1972 mit dem Staatsexamen.

Seit November 1972 bin ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München, Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Leidl für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Instituts für Andrologie und Künstliche Besamung an der Universität München, besonders Herrn Dr. R. Stolla, Herrn Dr. W. Schefels und Frau R. Haitchi danke ich für ihren Rat und ihre technische Hilfe.

Herr Dr. Fritz am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München stand mir beratend im biochemischen Bereich zur Seite. Auch ihm gilt mein Dank.

